MEDDELELSER

FRA

CARLSBERG LABORATORIET.

UDGIVNE

VED

LABORATORIETS BESTYRELSE.

II. BIND.

MED TRÆSNIT I TEXTEN OG 14 TAVLER.

1883—1888.

AVEC UN RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.

KJØBENHAVN.

I KOMMISSION HOS H. HAGERUP.

THIELES BOGTRYKKERI.

1888.



Indhold af II. Bind.

Første Hefte, 1883.

Andet Hefte, 1883.

Tredie Hefte, 1884.

Fjerde Hefte, 1886.

Femte Hefte, 1888.

En ny Methode til Kvælstofbestemmelse i organiske Stoffer.

Af

J. Kjeldahl.

Mellem Bestemmelserne af de elementære Bestanddele af de organiske Stoffer spiller den af Kvælstofmængden en vigtig og særegen Rolle. Thi medens Analysen af Kulstof- og Brintmængden i Regelen kun har Betydning ved rent videnskabelige Undersøgelser, til Fastsættelse af nye Stoffers Sammensætning o. lgn., har Bestemmelsen af Kvælstofmængden ved Siden deraf en overordentlig praktisk Vigtighed, navnlig som det eneste, hidtil kjendte, nogenlunde paalidelige Middel til Bedømmelse af Mængden af Æggehvidestoffer i de forskjellige Produkter af Dyre- eller Planteriget, for hvis Værdsættelse ofte netop Indholdet af de nævnte Stoffer afgiver den paalideligste Maalestok. Af de analytiske Arbejder, der forefalde i de praktiske Undersøgelses-Laboratorier, paa Forsøgsstationer for Landbruget og i fysiologiske Anstalter, er derfor ogsaa Bestemmelsen af Kvælstof ubetinget et af dem, der hyppigst forekomme. I mangfoldige Tilfælde vilde regelmæssige Analyser af denne Art ogsaa kunne være et værdifuldt Hjælpemiddel i forskjellige Fabrikationsgrene, hvor der arbejdes med kvælstofholdige Materialer. At saadanne ikke oftere foretages, end Tilfældet er, har dog sine nærliggende Grunde. En slig Analyse, hvad enten den foretages efter Dumas' eller efter Will og Varrentrapps Methode, selv med de Forbedringer i Udførelsen, som saa mange Aars Erfaringer og saa mange derpaa samvirkende Kræfter have hidført i disse, er altid en forholdsvis langvarig Sag, idet en enkelt Analyse kræver flere Timers Arbejde og i Løbet af denne Tid udfordrer en stadig Opmærksomhed fra Analytikerens Side. Deraf fremgaar,

at man ikke vil kunne bringe en slig Analyse til Anvendelse under Omstændigheder, hvor der maaske vilde kræves en længere Række saadanne Bestemmelser daglig, og hvor man til deres Udførelse ikke raader over en større Arbejdskraft. Naar dertil kommer, at en almindelig Elementaranalyse altid kræver et vist Maal af Færdighed og altsaa næppe vel lader sig udføre undtagen af en øvet Kemiker, og at den fordrer et særligt og kostbart Apparat (Forbrændingsovnen), er det indlysende, at den har maattet forblive indskrænket til de kemiske Laboratorier i snævrere Forstand, og at den selv indenfor disse i sin nuværende Skikkelse ofte har opslugt en betydelig Del af Kemikernes og Fysiologernes Tid.

Blandt de Fabrikationsgrene, for hvilke den omtalte Analyse spiller en særlig vigtig Rolle, staar Bryggerivæsenet i første Række. Det vilde her være meget ønskeligt at have en let Methode til Bestemmelse af Byggets Kvælstofholdighed, der har en saa stor Betydning for dets Anvendelse til Malt; Gjærens Indhold af Kvælstof vil det ligeledes oftere kunne have Interesse at erfare, ligesom det overhovedet under hele Fabrikationen er af megen Vigtighed at kunne bedømme, hvorledes Kvælstoffet fordeler sig imellem de forskjellige Produkter. Det var mig derfor magtpaaliggende at søge at tilvejebringe en Methode til Kvælstofbestemmelse, der paa en Gang var let at udføre, hurtig og nøjagtig, saa at man turde haabe, at den kunde vinde Indpas i den praktiske Bedrift, og hvorved paa den anden Side i videnskabelige Forsøgsstationer paa dette Omraade mangfoldige Arbejder vilde kunne tages for, og Spørgsmaal bearbejdes, som man hidtil ikke, eller i utilstrækkelig Grad, havde behandlet paa Grund af de analytiske Methoders Besværlighed og Langvarighed, der her ved det i Almindelighed saa let foranderlige Materiale var til dobbelt Hinder.

Særlig paatrængende blev dog dette Spørgsmaal for mig, da jeg for nogen Tid tilbage foresatte mig en speciel Undersøgelse af Æggehvidestoffernes Vandring og Opløsning under Brygningsprocessen, og derved idelig blev stillet overfor den med de forhaanden værende Methoder uløselige Opgave, i Løbet af kort Tid at skulle foretage betydelige Rækker af Kvælstofbestemmelser. Jeg lagde derfor foreløbig min Hovedopgave ganske til Side, for udelukkende at henvende min Opmærksomhed paa det omtalte Spørgsmaal. Jeg har derved været saa heldig at løse dette paa en meget tilfredsstillende Maade og opnaaet, at jeg herved kan forelægge Kemikerne en Methode, hvorved man med tilstrækkelig Nøjagtighed og med overraskende Hurtighed er istand til at bestemme Kvælstofmængden

i næsten alle organiske Stoffer. Naar dertil føjes, at den nye Methode yder mange andre, tildels meget væsentlige Fordele, som jeg i det følgende paa de paagjældende Steder skal have Lejlighed til at fremhæve, turde jeg vel have Anledning til at nære det Haab, at den vil vinde nogen Udbredelse i Praxis, særlig til agrikultur-kemiske og fysiologiske Undersøgelser.

Ved min Søgen efter en Fremgangsmaade til Kvælstofbestemmelse, der kunde opfylde de nævnte Fordringer til en let og hurtig Udførelse, har jeg fra først af stillet mig som Opgave at søge at gjennemføre denne ad den vaade Vej. Saasnart Behandlingen skal finde Sted ad den tørre Vej, og der skal anvendes Glødning, vil man altid være tvungen til at benytte et mere kompliceret Apparat med lufttætte Forbindelser, der koste meget Arbejde at tilvejebringe; man maa rykke langsomt frem med Ophedningen, paase, at Luftudviklingen foregaar paa regelmæssig Maade, og tvinges derved til uafbrudt at have sin Opmærksomhed fæstet paa Forbrændingens Gang, saa at man i det højeste kan have to Analyser i Arbejde paa samme Tid. Naar Reaktionen derimod foregaar i en Opløsning, er Manipulationen som oftest langt simplere, Apparatet let at sammenstille eller maaske endog reduceret til almindelige Bægerglas eller Kogeflasker. Ligesaalidt vil det i Regelen her være nødvendigt at lade Indvirkningen foregaa paa smaa Portioner ad Gangen; hyppigst blandes den hele Mængde af de Stoffer, der skulle reagere paa hverandre, strax sammen, og Reaktionen foregaar da enten med det samme eller fuldbyrdes først efter nogen Tids Henstand, uden at der dog i Løbet af denne Tid kræves mindste Tilsyn eller Pasning.

Paa den anden Side er man sjældent istand til at indvirke saa kraftigt paa de organiske Stoffer ad den vaade Vej, som det er nødvendigt for at opnaa Formaalet for en Elementaranalyse: en Iltning, som bevirker en fuldstændig Sønderdeling af Molekylet, og hvis Produkter alene ere Kulsyre, Vand og Kvælstof eller Ammoniak. Naar man tager Glødning til Hjælp, lykkes dette selv med mindre kraftige Iltningsmidler (Kobberilte), idet de organiske Forbindelser i Heden spaltes i simplere Grupper, og den høje Temperatur begunstiger Iltens Indvirkning paa disse. Ved slige høje Temperaturer forholde tilmed alle organiske Stoffer sig saa nogenlunde ens; i det højeste kan der være Tale om, at de ere let eller vanskelig forbrændelige. Anderledes er det ved Iltningen af en Opløsning: her er selv det aller kraftigste Iltningsmiddel, vi besidde, det manganoversure Kali utilstrækkeligt, idet herved i de fleste Tilfælde kun en Del af det organiske Stof omdannes til de

nævnte Endeprodukter, Kulsyre, Vand og Ammoniak (eller frit Kvælstof, hvad dog kun sjældent dannes under disse Omstændigheder), medens en anden Del overføres til visse, meget stabile Forbindelser, der haardnakket modsætte sig al videre Iltning. Dernæst forholde de organiske Stoffer sig meget forskjelligt i denne Henseende, idet nogle iltes fuldstændigt, medens andre kun angribes i ringe Grad.

Iltningen med manganoversurt Kali kan foretages enten i sur eller i alkalisk Opløsning. I første Tilfælde er Virkningen fuldstændigere, men næsten alle Undersøgelser have dog behandlet Iltningen i alkalisk Vædske, da Processen her foregaar roligere og lettere fører til vel karakteriserede Produkter. Det er navnlig Wanklyn, som, i Forbindelse med forskjellige Medarbejdere, har leveret talrige Arbeider herover, idet han har undersøgt Virkningen af Kali og manganoversurt Kali paa et stort Antal Stoffer, nærmest kun med den derved stedfindende Ammoniakdannelse for Øje. Han har derved søgt at paavise, at, om end kun et forholdsvis mindre Antal Stoffer herved afgive alt deres Kvælstof som Ammoniak, er det for hvert enkelt Stof altid en bestemt Procentmængde heraf, der omdannes paa den nævnte Maade. Idet han finder en saadan fælles Faktor for Æggehvidestoffernes Gruppe, grunder han derpaa den Bestemmelse af Kvælstof i organiske Forbindelser, som ved Analysen af Drikkevand er bleven saa almindelig anvendt, væsentlig paa Grund af den lette Udførelse, og fordi man her mangler en anden, nogenlunde haandterlig Methode. Derimod har den Anvendelse, som Forf. har søgt at gjøre af samme Methode til Bestemmelse af Kvælstof i Plantestoffer i Almindelighed, næppe opnaaet nogen Udbredelse udenfor England. Paa Grund af Sagens store Betydning, særlig for dette Laboratorium, har jeg for flere Aar tilbage anstillet en Del Forsøg efter Wanklyns Methode, dels med de yderst smaa Stofmængder, som den engelske Forfatter anvender, og Bestemmelse af Ammoniaken kolorimetrisk med Nesslers Reagens, Jodkviksølv-Jodkalium, dels, da denne Bestemmelsesmaade dog nærmest maa betragtes som en Nødhjælp, der anvendes, hvor Omstændighederne gjøre det nødvendigt at arbejde med smaa Spor, f. Ex. ved Vandanalyser, med en lignende Stofmængde, som den, der almindelig anvendes til kvantitative Analyser, og Bestemmelse af Ammoniaken ved Titrering. I alle Tilfælde fandt jeg imidlertid, at Ammoniakdannelsen var ganske ufuldstændig, og, hvad værre var, Resultaterne temmelig uoverensstemmende.

En Redegjørelse over Wanklyns og andre Forfatteres Arbejder paa dette Omraade er vel ikke direkte nødvendig til Forstaaelse af det følgende, men da en Oversigt dog for Sammenligningens Skyld vil kunne have Interesse for Læserne af dette Tidsskrift, vil jeg i nedenstaaende Anmærkning meddele et ganske kortfattet Uddrag af disse Forsøg[1]).

---

[1]) I sin første Meddelelse herom antager Wanklyn, at Albuminstofferne afgive alt deres Kvælstof som Ammoniak ved Kogning med Kali og manganoversurt Kali, og mener endogsaa at have gjort den Iagttagelse, at de ved Kogning med Kali alene (naar denne fortsættes tilstrækkelig længe) afgive en Trediedel, ved derpaa følgende Tilsætning af Permanganatet de to andre Trediedele. Ved Bestemmelsen af Kvælstof i Drikkevand tages 1 Litre Vand for, hvoraf der afdestilleres tre Fraktioner: 1; 300—500 Kub. Centimeter efter Tilsætning af lidt kulsurt Natron. Destillatet indeholder Kvælstoffet fra Ammonsalte og Urinstof. 2; 300 Kub. Centimeter efter Tilsætning af 10 Kub. Centimeter stærk Kalioplosning. Heri findes henved en Trediedel af Albuminstoffernes Kvælstof. 3; 500 Kub. Centimeter efter Tilsætning af Permanganat. Heri findes Resten af Albumin-Kvælstoffet (Wanklyn, Chapman og Smith i Journal of the Chemical Society, Entire Series, Vol XX, 1867, pag. 444).

I deres næste Afhandling (l. c., pag. 593) angive de samme Forff. imidlertid, at Ammoniakudbyttet ikke svarer til den hele Mængde, som Æggehvidestofferne theoretisk vilde kunne udvikle, men kun til to Trediedele heraf, idet de dog fastholde, at det er en aldeles konstant Brøk, der faas paa denne Maade. I den sidste Meddelelse af Wanklyn og Cooper (Philosophical Magazine, 5 Series, Vol. III, 1877, pag. 382) angives derimod, at man erfarer Proteïnstofmængden, ved at multiplicere den fundne Ammoniakmængde med 10. Da Proteïnstoffer af den almindelige Sammensætning med omkring 16 % Kvælstof ville kunne give omtrent 20 % Ammoniak, ses det, at vi nu kun skulde faa Halvdelen af den theoretiske Mængde. Forff.s Angivelser ere saaledes i stærk Modsigelse med hverandre.

I Journal of the Chemical Society, Ent. Ser., Vol. XXI, 1868, pag. 161, findes en længere, interessant Afhandling af Wanklyn og Chapman, hvori de for et stort Antal organiske Stoffer give Oplysning om det Omfang, hvori disse afgive deres Kvælstof som Ammoniak ved Behandling med Kali og Permanganat. I de nedenstaaende Tabeller er sammenstillet de Resultater, hvortil de nævnte Forff. ere komne.

Følgende Stoffer afgive paa denne Maade alt deres Kvælstof som Ammoniak:

	Beregnet Ammoniakudbytte af den hele Kvælstofmængde.	Fundet.
Asparagin	22,66 %	21,92 %
Piperin	5,96 -	5,41 -
Saltsurt Diamylamin	8,79 -	7,93 -

Det er en meget nærliggende Tanke, at Resultaterne vilde falde bedre ud, naar man foretog Iltningen i en sur Vædske, idet

	Beregnet Ammoniakudbytte af den hele Kvælstofmængde.	Fundet.
Amylamin	19,54 %	21,8 %
Difenyltartramid $C_{16}H_{16}N_2O_4$.	11,33 -	10,21 -
Piperidin, Hippursyre, Narkotin	Ingen Talangivelser.	

Følgende afgive Halvdelen:

	Beregnet Ammoniakudbytte af den halve Kvælstofmængde.	Fundet.
Morfin	2,98 %	2,80 %
Codëin	2,67 -	3,00 -
Papaverin	2,50 -	2,20 -
Strychnin	5,09 -	5,45 -
Methylstrychninjodid . . .	3,57 -	3,33 -
Brucin	4,32 -	4,60 -
Svovlsurt Chinin	4,56 -	4,50 -
Svovlsurt Cinchonin . . .	4,76 -	5,55 -
Nikotin	10,49 -	10,80 -
Naftylamin	5,95 -	6,73 -
Toluidin	7,95 -	8,56 -
Saltsurt Rosanilin	7,06 -	6,43 -

Kreatin afgiver en Trediedel af sit Kvælstof som Ammoniak, Thëin en Fjerdedel. Urinsyre gav omtrent 7 % Ammoniak (næppe mere end en Sjettedel af hele Kvælstofmængden), Gelatine 12,7 %, Kasëin 7,6 %. Albumin 10 %.

Overensstemmelsen mellem de fundne og de beregnede Tal synes dog i de fleste Tilfælde ikke at være tilstrækkelig til derpaa at grunde en analytisk Methode. Dette kan maaske tildels ligge i Bestemmelsen af Ammoniaken ved Nesslers Reagens, om hvilken Forff., skjøndt de meget fremhæve dens store Fortrin, dog indrømme, at den sandsynlige Fejl ved ikke særlig øvede Iagttagere er 5 %. Naar imidlertid Kvælstofmængden i Amylamin, som man vil se i Tabellen, er funden mere end 11 % højere end beregnet, kan dette vel næppe tilskrives andet, end en saa stor Fejl i Ammoniakbestemmelsen.

Frankland og Armstrong (l. c., pag. 77) fik efter denne Fremgangsmaade ved Strychnin 32 %, ved Narkotin 46 %, ved svovlsurt Chinin 57 % af den hele Kvælstofmængde som Ammoniak. Ved Franklands Methode til Bestemmelse af det organiske Kvælstof i Drikkevand (Forbrænding af den inddampede Rest med Kobberilte og Bestemmelse af det luftformige Kvælstof) fandtes i Almindelighed langt højere Resultater end ved Wanklyns.

Wanklyn og Gamgee (l. c., pag. 25) meddele Forsøg over Iltning af Urinstof, Ammoniak og Acetamid ved Overskud af Permanganat i stærk alkalisk Opløsning og ved høj Temperatur (130—

Tilbøjeligheden til Ammoniakdannelse under disse Omstændigheder maatte antages at være større. Det viste sig i Virkeligheden

160°, i tilsmeltede Glas). Under disse Omstændigheder afgives alt Urinstoffets Kvælstof i luftformig Tilstand, ved noget mindre Mængde manganoversurt Kali faas dels Kvælstof, dels Nitrat. Ved de højeste Temperaturer dannes der slet ikke Ammoniak, ved 100° derimod i rigelig Mængde, dog ikke svarende til mere end 22—30°/0 af Kvælstofmængden (i en tidligere Meddelelse have Forff. gjort opmærksom paa, at medens ublandet Urinstof næppe dekomponeres ved Kogning med kulsure eller kaustiske Alkalier, sker dette let, naar det, som Tilfældet er i urent Vand, er blandet med forskjellige andre kvælstofholdige Dekompositionsprodukter). Ammoniak (Chlorid eller Sulfat) gaar helt over til Nitrat, efter endt Proces findes der hverken Ammoniak eller Kvælstof i Glasset. Acetamid forholder sig paa samme Maade.

Hoogewerf og van Dorp (Berichte der deutschen chem. Gesellschaft, X, 1877, pag. 1936 og XI, 1878, pag. 1202) arbejde paa samme Maade som Wanklyn, men med større Stofmængder. Anilin afgiver Halvdelen af sit Kvælstof som Ammoniak (fra 47,3 til 55,2°/0) og omtrent en Trediedel som Azobenzol. Dette angribes slet ikke yderligere af manganoversurt Kali. Chinin afgiver lideledes Halvdelen som Ammoniak, Orthotoluidin ligeledes, Paratoluidin kun 40°/0.

Analysen af Plantestoffer foretage Wanklyn og Cooper (Phil. Magaz., [5], III, pag. 382) paa følgende Maade. 1 Grm. Stof afvejes i en Litreflaske, der tilsættes 20 Kub. Centimeter en Tiendedel normal Kalioplosning, Vand føjes til indtil Mærket, der rystes godt op, og 10—20 Kub. Centimeter (svarende til ligesaa mange Milligram Stof) udtages til en Analyse. 3—500 Kub. Centimeter Vand bringes i en Retort med 50 Kub. Centimeter Kalioplosning (hvori 10 Grm. Kalihydrat) og 0,4 Grm. manganoversurt Kali, hvorpaa ethvert Spor af tilstedeværende Ammoniak udkoges. Efter Tilsætning af Analysen destilleres paany, og Ammoniakmængden i Destillatet bestemmes ved Nesslers Reagens. Forff. anføre en Del Bestemmelser, udførte paa denne Maade i forskjellige Prøver af Hvedemel og andre Plantesubstantser. Om Kontrolbestemmelser ved Forbrænding med Kobberilte eller Natronkalk er der mærkelig nok ikke Tale hverken i dette eller i noget af Forff.s tidligere Arbejder.

Imod den Maade, hvorpaa Analysen her forberedes, maa der vistnok rejses en stærk Indsigelse, idet Forff. gaa ud fra den Forudsætning, at Æggehvidestofferne skulde opløse sig fuldstændigt i det kaliholdige Vand. Om nu saadant vel kan finde Sted ved rene Præparater, vil det paa den anden Side være bekjendt for enhver, der har beskjæftiget sig med Analysen af Plantedele, at det aldrig ved Behandling af disse med fortyndet Kalioplosning lykkes at faa en kvælstoffri Rest, men at som oftest endogsaa en meget betydelig Del af Kvælstoffet unddrager sig Udtrækningen. Med Hensyn hertil kan ogsaa henvises til en Afhandling af R. Wagener i Landwirthschaftliche Versuchsstationen, Bd. 25, 1880, pag. 195; skjøndt Forf.

ogsaa, at Udbyttet af Ammoniak blev betydelig forøget, naar man til Opløsningen af Æggehvidestoffet satte fortyndet Svovlsyre, dernæst iltede med et Overskud af manganoversurt Kali under Kogning og til Slutning destillerede efter Overmætning med Natron. Paa denne Maade fik jeg i nogle Forsøg omtrent 70% af det i Æggehvidestoffet tilstedeværende Kvælstof som Ammoniak. Da Omdannelsen dog altsaa ogsaa i dette Tilfælde var ufuldstændig og Overensstemmelsen mellem Resultaterne ingenlunde bedre, var der saaledes i analytisk Henseende ikke vundet noget ved denne Forandring.

Ganske anderledes stille Forholdene sig imidlertid, naar man først underkaster de tørre Stoffer en stærk Opvarmning med koncentreret Svovlsyre, idet de herved, saa godt som uden Undtagelse, dekomponeres til Forbindelser, der ved paafølgende Iltning med manganoversurt Kali afgive deres Kvælstof fuldstændigt til Syren i Form af Ammoniak. Principet for den nye Methode er derfor følgende: Man opvarmer det afvejede Stof i en lille Kogeflaske med en forholdsvis anselig Mængde koncentreret Svovlsyre til en Temperatur, der nærmer sig Svovlsyrens Kogepunkt, og ilter dernæst den paa denne Maade tilvejebragte Opløsning med et Overskud af tørt, pulverformigt Permanganat.

Det vil let ses, at man næppe vel kan tænke sig en kraftigere Maade at indvirke paa et organisk Stof, naar man ikke skal skride til Glødning, naar Behandlingen skal foregaa ad den vaade Vej. Men heldigvis har, som sagt, denne Behandling ogsaa i det overvejende Antal Tilfælde vist sig at være tilstrækkelig.

En Hovedbetingelse for i det hele taget at kunne anvende den her omtalte Fremgangsmaade, er den, at der under de nævnte Betingelser ikke finder nogen Dekomposition Sted af Ammoniaken. Om svovlsurt Ammon angives, at det ved 280° begynder at de-

anvender en langt stærkere Kalioplosning (0,125% KOH) end Wanklyn (0,0108% KOH), bliver dog i de forskjellige Plantesubstantser, han har undersøgt (Havre, Hvedeklid, Boghvede, Palmekage o. fl.), fra 6 til 50% af den hele Kvælstofmængde uopløst tilbage.

Ordene i den engelske Original (»The contents of the flask are then shaken up so as to ensure thorough mixture«) kunne vel antyde, at Forff. tænke sig Mulighoden af, ved stærk Omrystning at tilvejebringe en aldeles jævn Opslemning af Stoffet, saa at man, ved at udtage en Hundrededel af Vædsken, ogsaa vilde faa en Hundrededel af Analysen; men Tilsætningen af Kalioplosningen synes dog at vise, at de tilstræbe en Opløsning af Proteïnstofferne.

komponeres, idet Syren virker iltende paa Ammonet, saa at der dannes Vand og frit Kvælstof. Da denne Temperatur er lavere end Svovlsyrens Kogepunkt, vil det svovlsure Ammon i mine Forsøg altsaa almindeligvis blive udsat for en saa høj Varme, at en Afspaltning af frit Kvælstof kunde befrygtes, hvorved dog maa erindres, at Opvarmningen her, med det store Overskud af Syre, foregaar under væsentlig andre Betingelser, end de, hvortil hin Angivelse refererer sig, Ophedning af Saltet for sig. End mere synes en Sønderdeling at kunne befrygtes ved Iltningen med det manganoversure Kali, der under de Omstændigheder, hvor den her foretages, finder Sted under meget voldsomme Fænomener. Forsøget viser imidlertid, at der hverken ved den blotte Opvarmning med Syre eller ved Iltningen tabes Ammoniak: 0,0925 Grm. svovlsurt Ammon blev opvarmet i 4 Timer med 10 Kub. Centimeter koncentreret Svovlsyre til en saa høj Temperatur, at Syren stod paa Nippet til at koge; derefter tilsattes hurtigt pulverformigt Permanganat i rigelig Mængde, og Ammoniaken afdestilleredes efter Overmætning med Natron. Man fik en Mængde, der svarede til 0,0923 Grm. svovlsurt Ammon, altsaa lig med den indvejede Mængde. Dette er kun et mellem flere lignende Forsøg, som jeg har udført, da det herved indvundne Resultat, som sagt, er af fundamental Vigtighed for Methodens Brugbarhed.

Ved Udførelsen af en Analyse gaar man frem paa følgende Maade:

Det foreliggende Stof afvejes i en lille, i Forvejen vejet Kogeflaske, den samme, i hvilken det skal lide den paafølgende Behandling. Dette er allerede ved faste Stoffer en ret bekvem Omstændighed, men, hvor det drejer sig om Bestemmelsen af Kvælstof i Opløsninger, bliver det en meget betydelig Lettelse i Arbejdet. Man tænke blot paa de forskjellige Kunstgreb, som man ved slige Lejligheder maatte ty til; saaledes Inddampning i de Hofmeisterske Skaale af meget tyndt Glas, som tilligemed Analysen pulveriseredes med Natronkalk og indførtes i Forbrændingsrøret. Det var dog herved ikke altid let at undgaa, at der sprang smaa Stykker bort under Pistillen, ligesom det ofte voldte Besvær at faa de meget tynde og flade Glasskaar med det derpaa siddende Stof tilbørlig findelte og blandede med Natronkalken. Den Methode, som vi hidtil hyppigst have anvendt paa Carlsberg Laboratorium, er udtænkt af Reischauer. Man lader her den paagjældende Opløsning fra en Byrette langsomt dryppe ned paa Kviksølv, der i en flad Jern-kaal (Gjennemsnit 18 Centimeter, Dybde 2,5 Centimeter) holdes opvarmet til henimod 100°; efter at al Vædsken er nedbragt, lader

man Varmen stige til omtrent 110°, for hurtigt at opnaa en fuldstændig Udtørring. Denne Fremgangsmaade er meget elegant og forholdsvis let at udføre, men kræver dog ogsaa noget Arbejde og en Del Paapasselighed. Prof. Aubry inddamper Opløsningerne i smaa Kapsler af Staniol; naar disse ere bragte i Blandingsmorteren, amalgameres Tinnet ved en Draabe Kviksølv, hvorefter det hele let lader sig pulverisere og blande med Natronkalken. Trods det sindrige ved flere af disse Fremgangsmaader er det dog ulige heldigere, ganske at kunne undvære dem, hvad der, som sagt, er Tilfældet ved den nye Methode. Her behøver man blot at afveje eller afmaale det fornødne Kvantum Opløsning i den lille Kogeflaske; naar Vandet da efter nogen Tids Henstand i Tørreskabet er dampet bort, har man just Extraktet paa det Sted, hvor man skal have det.

Angaaende den Stofmængde, som man passende bør tage til en Analyse, da skal jeg senere komme nærmere tilbage hertil.

Man tilsætter nu en forholdsvis anselig Mængde koncentreret Svovlsyre, ikke gjerne mindre end 20—40 Gange det afvejede Stof. Indenfor temmelig vide Grændser er Mængden deraf vel ligegyldig, men, da det dog af flere Grunde er bekvemt altid at bruge det samme Maal, har jeg altid taget 10 Kub. Centimeter. Man opbevarer da sin Svovlsyre i en Flaske, der lukkes med en Kautschukprop, hvorigjennem der gaar en 10 Kub. Centimeters Pipette, som, naar den ikke bruges, holdes vel tillukket med en Stump Slange og en Glasprop. Man maa i det hele vise megen Omhu for at forhindre Syren fra at indsuge Ammoniak. Det er en nærliggende Indvending mod Methoden, at Faren for at sligt kan indtræffe er langt større her, end ved Anvendelsen af Natronkalk; tilmed kan man udgløde den sidste før Brugen, medens man paa ingen Maade kan fjærne den Ammoniak, som Svovlsyren engang har indsuget. Imidlertid lader dette sig meget vel undgaa, naar man blot viser den tilbørlige Forsigtighed, sørger for, at ingen Draaber af Syre blive siddende paa Flaskens Prop, paa dens Krave eller i dens Hals og navnlig, naar Syren opbevares paa den nys omtalte Maade. Jeg vil dog her til dem, der ville benytte Methoden, anbefale en Forsigtighedsregel, som jeg altid har anvendt, naar jeg foretog en Række af Analyser, nemlig at ledsage disse med et Kontrolforsøg, hvortil tages 10 Kub. Centimeter koncentreret Svovlsyre alene, eller, hvad der af Grunde, jeg senere skal fremhæve, er at foretrække, med noget rent Sukker, men som forøvrigt behandles ganske som de øvrige Analyser, opvarmes ved Siden af disse og lige saa længe, faar sin Tilsætning af manganover-

surt Kali og tilsidst afdestilleres efter Overmætning med Natron. Undertiden faas da paa denne Maade O Kvælstof, men i Almindelighed indeholder den rene Syre, som gaar i Handelen, et, om end kun yderst ringe, Spor af Ammoniak, for hvilket da maa indføres en lille Korrektion i de egentlige Analyser (jvfr. Exemplerne p. 21). Størrelsen af denne Korrektion er det imidlertid lykkedes mig at holde uforandret, selv efter at Syren havde henstaaet flere Maaneder i Laboratoriet.

Kogeflasken hensættes nu paa et Metaltraadsnet over en lille Gasflamme. I næsten alle Tilfælde bliver dens Indhold nu brunt, dernæst hurtigt sort og tjæreagtigt, samtidig med, at der udvikles en Del Svovlsyrling og udstødes hvide Dampe; at hele Processen maa foregaa i et lukket Arbejdsskab med godt Aftræk, behøver jeg ikke her at fremhæve. Nogle Stoffer, som Æggehvidestofferne, opløses næsten strax af Svovlsyren til en mørk, uklar Vædske, andre, f. Ex. Kulhydraterne, paavirkes saaledes, at de tilsyneladende forvandles til et porøst og glindsende Kul. Men idet nu Temperaturen stiger, indtræder der paa engang en meget livlig Reaktion med stærk Luftudvikling, og, hvad der hidtil var uopløst, gaar nu ligeledes i Opløsning. I dette Stadium finder der en stærk Stænkning Sted, hvorfor de Kogeflasker, man benytter, bør have en temmelig snæver Aabning og helst en lang Hals; ved denne sidste er ogsaa den Fordel, at Svovlsyredampene, der ellers kunne være temmelig besværlige, næsten fuldstændigt fortættes. I Henseende til Størrelse og Form svarer en almindelig 100 Kub. Centimeters Kolbe eller en Flaske af samme Rumfang med konisk Legeme meget godt til Øjemedet. Imidlertid spiller ogsaa Glassets Beskaffenhed en vigtig Rolle ved Valget, da de forskjellige Glassorter i meget forskjellig Grad modstaa Indvirkningen af den stærke og hede Syre. Ofte angriber denne Glasmassen meget stærkt, endnu oftere hænder det, at Kolben springer efter en eller flere Opvarmninger, i Regelen dog kun ved meget fine Revner, som kun give sig tilkjende ved de Svovlsyredampe, som herfra stige op langs Kolbens Ydreside. Almindelige 100 Kub. Centimeters Kolber og nogle Kolber, jeg efter Tegning lod forfærdige her i Byen, gik paa denne Maade strax til Grunde. Nogle Kogeflasker, som jeg erholdt fra H. Struers Handel med kemiske Utensilier, viste sig derimod at være af en Glasmasse, der i enhver Henseende tilfredsstillede de nævnte Fordringer, saa at man kunde udføre et meget betydeligt Antal Analyser i hver af dem, uden at den oprindelige Vægt, der var noteret paa dem, forandredes mere end 10 – 20 mgrm. Da Form og Størrelse dog ikke vare ganske

efter Ønske, har jeg sammesteds bestilt andre af samme Glasmasse, men efter opgiven Tegning, og haaber derved at faa en Kogeflaske, der intet lader tilbage at ønske til dette Brug.

Saalænge den stærke Stænkning vedvarer, kan man lade Kogeflasken ligge ned, med Halsen støttet mod en Korkprop paa Trefodens Ring. Er den tilende, rejser man Kogeflasken op paany, og idet man giver saameget Varme som muligt, det vil sige saameget, at det af og til giver et lille Stød i Vædsken, uden at det dog kommer til Kogning, vil man se de fortættede Svovlsyredampe paa en ret smuk Maade vaske Glassets Sider rene og føre de paa disse siddende, forkullede Partikler ned i Vædsken igjen; for at fremskynde dette, kan man vel ogsaa af og til vende og dreje Flasken saaledes, at Syren føres rundt overalt paa dens Indreside. Men forøvrigt kræve Analyserne i den Tid, Opvarmningen staar paa, aldeles intet Tilsyn, hvad der netop er et af Methodens væsentligste Fortrin, da man som Følge deraf bliver istand til at tage et meget betydeligt Antal Prøver for ad Gangen. Erfaringen viser, at det ikke volder nogen Vanskelighed at regulere Flammens Størrelse, da det overhovedet slet ikke kommer an paa, at Varmegraden holdes særlig konstant. Det væsentlige er blot, at Varmen i det hele taget er høj; det er paafaldende, hvor ufuldstændig Ammoniakdannelsen bliver, naar man kun varmer til 100—150°.

Jo mere Svovlsyre, der tages i Forhold til Stofmængden, desto lettere foregaar, som man kan vide, Opløsningen af dette, og desto mindre lider man af Stænkningen. Denne er ligeledes, paa Grund af de pag. 11 omtalte Forhold, ringere ved rene Æggehvidestoffer, end hvor disse ere blandede med store Mængder Kulhydrater. Ved Anvendelse af 10 Kub. Centimeter Svovlsyre tør man dog næppe nogensinde anvende mere end 1 Grm. Stof, da Massen ellers fra Begyndelsen bliver for tyk, og Stænkningen saa stærk, at man let er udsat for at lide Tab derved.

Den tidligere omtalte, livlige Reaktion varer kun meget kort, og derefter er Virkningen tilsyneladende forbi. At dette dog ikke ganske er Tilfældet, men at Svovlsyren vedblivende udøver en langsom, iltende Virkning, faar man at se paa en ret overraskende Maade, naar Opvarmningen fortsættes. Man vil da se, at den tykke, næsten tjæreagtige, uigjennemsigtige og ganske uklare Opløsning (det sidste ses ved Fortynding med Vand) efterhaanden bliver lidt gjennemskinnende, saa dyb mørkebrun og ganske klar, saa lysebrun, derefter lysegul og endelig ganske ufarvet og vandklar. For at naa hertil, vil det imidlertid som oftest være nødvendigt,

at fortsætte Opvarmningen i særdeles lang Tid, indtil et Par Dage. Denne Affarvning kan dog i meget høj Grad paaskyndes, ved at blande den engelske Svovlsyre med noget rygende Svovlsyre, for at kompensere den førstes Overskud af Vand over Hydratvandet, og navnlig ved Tilsætning af noget Fosforsyreanhydrid.

Med en saadan Blanding af Svovlsyrehydrat og Fosforsyreanhydrid vil Opløsningens Farve i Regelen være bleven ganske lysebrun efter blot to Timers Opvarmning. At det herved ogsaa spiller en Rolle, om man har anvendt meget eller lidet Stof, er en Selvfølge. Forøvrigt har jeg overbevist mig om, at det i Regelen ingenlunde er nødvendigt at fortsætte Opvarmningen, til Vædsken har faaet denne lyse Farve, for at Ammoniakdannelsen skal blive fuldstændig. Idetmindste ved Æggehvidestofferne og deres Derivater, som er det, der overvejende hyppigst foreligger til Bestemmelse, viste det sig, at Opvarmning med engelsk Svovlsyre var tilstrækkelig, og at man fik lige saa høje Resultater, ved at standse denne, medens Vædsken endnu var ganske sort, som ved at fortsætte den, til den blev lysebrun. Imidlertid gives der andre Stoffer, hvis Kvælstof holdes mere haardnakket bundet (jvfr. pag. 14), og, hvor saadanne kunne antages at foreligge, gjør man derfor bedst i at vælge Arbejdsmaaden med Fosforsyreanhydrid, hvor man altid i den indtrædende Affarvning har et sikkert Kriterium paa, at Svovlsyrens Virkning er tilende. At Glasset herved angribes meget stærkere, end ved Anvendelse af Svovlsyre alene, maa her fremhæves.

Ved Svovlsyrens Indvirkning gaa nu alle organiske Stoffer, Æggehvidestoffer, Kulhydrater, aromatiske Forbindelser o. s. v., uden Undtagelse i Opløsning, som kun efter Opvarmningens Varighed er mer eller mindre klar, mer eller mindre farvet. Ogsaa dette er en Omstændighed, der taler meget til Gunst for den nye Methode. Ritthausen, der har en saa stor Erfaring i Analysen af kvælstofholdige Stoffer, fremhæver gjentagende Nødvendigheden af at anvende den yderste Findeling af Æggehvidestofferne, forinden de underkastes Forbrændingsanalysen, og fremhæver tillige, hvor besværligt et Arbejde dette i mange Tilfælde kan være. Jeg har flere Gange havt Lejlighed til at gjøre den samme Iagttagelse om Nødvendigheden af en saadan Findeling og ofte funden, at man, ved at drive denne endnu et Skridt videre, ogsaa opnaaede endnu et lille Plus i Udbyttet af Kvælstof. Forholdet er ganske vist ikke aldeles konstant; undertiden kan man ved et Materiale faa ligesaa meget, naar man brænder det noget grovere Pulver, som det allerfineste; undertiden er det modsatte, som sagt, Tilfældet. Hvorpaa denne Forskjel kan bero, er ikke godt at sige;

muligvis spiller den forskjellige Struktur og den forskjellige anatomiske Lejring af Æggehvidestofferne i de naturlige Plantedele en Rolle i denne Henseende. Men da man ikke i Forvejen kan vide, hvornaar det ene vil være Tilfældet og naar det andet, har jeg ved alle Forbrændingsanalyser gjort mig det til Regel at underkaste det paagjældende Stof en særdeles omhyggelig Findeling. Da dette, paa Grund af Faren for en Desagregation, ikke vel lader sig udføre paa et større Parti, har jeg i en meget rummelig Porcellainsmorter revet det afvejede Stof med Pulver af tungsmelteligt Glas eller end bedre med Kvartspulver, indtil det hele, Skaldelene medindbefattede, var reduceret til en støvfin Masse. Tilvisse et meget anstrængende og besværligt Arbejde, da det baade udfordrer en betydelig Kraftudvikling og en spændt Opmærksomhed paa, at intet gaar tilspilde! Dette falder selvfølgelig ganske bort ved den nye Methode, hvor man blot behøver at fremstille et Pulver, der er fint nok, til at man kan være sikker paa at faa en rigtig Gjennemsnitsprøve. Den øvrige Findeling besørges da ved Svovlsyrens Indvirkning paa en langt radikalere Maade, end ved den aller omhyggeligste Pulverisation. Selv hele Korn kunne let analyseres paa denne Maade.

Ved Opvarmningen med Svovlsyre er allerede den største Del af Omdannelsen fuldbyrdet. Mange Stoffer afgive allerede paa denne Maade alt deres Kvælstof, eller næsten alt, i Form af Ammoniak. Saaledes Urinsyre, Asparagin, de let dekomponible Gluten-Protëinstoffer o. fl. Andre Æggehvidestoffer og idethele andre Stoffer indenfor de fede Legemers Gruppe afgive idetmindste paa denne Maade den ganske overvejende Mængde af deres Kvælstof, 90—95 %, eller der omkring. Ved Stoffer, der tilhøre den aromatiske Gruppe, holdes Kvælstoffet derimod mere haardnakket tilbage i den organiske Forbindelse. Dette er allerede Tilfældet, hvor det endnu er tilstede som Amid, som f. Ex. i Anilinsalte, idet Forbindelsen mellem Benzolkjærnen og Amidgruppen er langt vanskeligere at ophæve, end mellem denne og den aabne Kulstofkjæde. Men endnu langt mindre Omfang faar Ammoniakdannelsen ved Svovlsyrens Indvirkning, naar vi gaa over til Stoffer, i hvilke Kvælstoffet maa antages bundet paa ikke amidagtig Vis. Saadant har man antaget for mange Alkaloiders Vedkommende, ved hvilke der er Sandsynlighed for, at Kvælstoffet indgaar som Led i selve Benzolkjærnen. I Overensstemmelse hermed finder man da ogsaa her Ammoniakdannelsen ved Opvarmning med Svovlsyre at være yderst ufuldstændig. Naar man saaledes, for at nævne et Exempel, behandlede lige Mængder almindeligt Albumin, Morfin og Kinin i

lige lang Tid med ligemeget Svovlsyre, fik man af Albuminets Kvælstof de 92 % som Ammoniak, af Morfinets kun 40 % og af Kininets endogsaa kun 25 %. Af alle de Forbindelser, jeg har undersøgt, var forøvrigt Kininet det, der vanskeligst dekomponeredes ved den nævnte Proces. Ved Kafféin var Ammoniakdannelsen derimod under de samme Omstændigheder atter temmelig fuldstændig, hvilket stemmer med, at Kafféin, som dets nys fuldbyrdede Synthese af Xanthin viser, hører hjemme mellem de fede Legemer og ikke mellem de aromatiske. Man vil altsaa se, at vi i den mer eller mindre fuldstændige Ammoniakdannelse ved Indvirkning af varm, koncentreret Svovlsyre have et ret interessant Middel til at bedømme den Fasthed, hvormed Kvælstoffet er bundet i de organiske Forbindelser.

Det er værdt at lægge Mærke til, at den Lethed, hvormed Kvælstoffet afspaltes som Ammoniak ved Svovlsyrens Indvirkning, slet ikke synes at staa i noget Forhold til det Omfang, som Ammoniakdannelsen naar ved de samme Stoffers Iltning med manganoversurt Kali i alkalisk Opløsning efter Wanklyns Methode. Asparagin afgiver vel saaledes ved begge disse Behandlingsmaader alt sit Kvælstof som Ammoniak, Urinsyre giver derimod ved Wanklyns Proces kun en Sjettedel af sit Kvælstof som Ammoniak, medens det hele let omdannes hertil ved Svovlsyre. Kafféin afgiver til Svovlsyre næsten alt Kvælstof, medens det ved Destillation med Kali og manganoversurt Kali kun giver en Fjerdedel deraf. Omvendt afgiver Kinin, der saa vel modstaar Svovlsyren, ved den anden Behandling en langt større Procentmængde af sit Kvælstof (57) som Ammoniak, end mange Stoffer, som vi her betegne som de lettest dekomponible.

Efter tilstrækkelig Indvirkning af Svovlsyren skrider man til Iltningsprocessen. Denne foretages med manganoversurt Kali, der i sin Virkning her staar langt over alle andre Iltningsmidler. Jeg har prøvet flere saadanne, f. Ex. tvechromsurt Kali, men altid funden, at de paa ingen Maade kunne erstatte det manganoversure Kali, idet Ammoniakdannelsen ved dem altid forblev ufuldstændig. Permanganatet anvendes i Form af et tørt, nogenlunde fint Pulver; da Virkningen er særdeles voldsom, maa det kun tilsættes i smaa Portioner ad Gangen, som man imidlertid godt kan lade følge saa hurtig som muligt ovenpaa hverandre, da Reaktionen foregaar saa at sige momentant. Pulveret bør derfor tilføres i en fin, men kontinuerlig Strøm, hvilket kan opnaas paa flere Maader. Længe hjalp jeg mig med en Glasspatel, som holdtes over Flaskens Munding, og hvorpaa Pulveret var anbragt. Ved passende smaa Slag

herpaa bragtes Pulveret nu til at falde ned i Syren, men da man dog paa denne Maade let er udsat for, at der kommer formeget med ad Gangen, har jeg senere benyttet mig af en lille Bøsse, som enhver let kan forfærdige sig, og som yder god Tjeneste. Den bestaaer af et omtrent Tomme-vidt Glasrør, som forneden gaar jævnt over i et kort, snævrere Rør — f. Ex., den øverste, afsprængte Del af et almindeligt Svalerør. I Bunden af det videre Rør anbringes et Stykke Metaltraadsnet af passende Finhed, ovenpaa hvilket Pulveret af Permanganatet anbringes. Ved nu at holde denne Bøsse over Mundingen af Kogeflasken og banke let derpaa, vil man bekvemt opnaa, at Pulveret i den rette Takt drysser ned i Syren. Iltningen skal foretages paa den varme Vædske, dog fjærner man Lampen, saalænge selve Tilsætningen af Pulveret finder Sted; i Regelen er denne tilendebragt i en Brøkdel af et Minut. Reaktionen er, som oftere berørt, yderst voldsom, ledsaget af Forpufninger og Udstødelsen af en stærk, hvid eller grøn Røg, ligesom man ofte ser smaa Flammer bryde frem af Vædsken. Ved saa heftige Fænomener paatrænger den Tanke sig uvilkaarlig, at der maa finde Dekomposition af Ammoniak Sted. Imidlertid har en paa flere hundrede Forsøg støttet Erfaring vist, at der ikke nogensinde lides Tab paa dette Punkt af Arbejdet, selv om man foretager Iltningen saa hurtigt, som det vel lader sig gjøre (jvfr. ogsaa pag. 8).

Permanganatet skal, som sagt, tilsættes i Overskud. Hvornaar dette er naat, ses meget let af de Farveforandringer, som ledsage Processen. Vædsken, der oprindelig i Regelen var sort eller brun, bliver ved Tilsætning af Iltningsmidlet hurtigt lysere, dernæst ganske ufarvet og ved yderligere Tilsætning smuk grøn, eller, ved Anvendelse af Fosforsyreanhydrid, blaagrøn. Denne grønne Farve skyldes dog alene Pulveret, som nu tilsyneladende ikke opløses mere, Vædsken har, som det ses, naar det hele har klaret sig ved nogen Henstand, en violet Farve. Begge Dele pege hen paa, at det er Mangantveiltesalt, som her har dannet sig. Naar den grønne Farve er indtraadt, er Iltningen forbi. I Almindelighed har jeg derefter plejet at lade Kogeflasken henstaa endnu i 5—10 Minutter over en ganske svag Flamme, uden at dette dog vistnok bør tilskrives synderlig Betydning. Derimod maa man vel vogte sig for paany at varme Blandingen stærkt, efter at den grønne Farve er kommen frem. Der indtræder da under stærk Iltudvikling Reduktion til Manganforiltesalt, idet Vædsken paany bliver lys, noget, jeg oftere har havt Lejlighed til at se forbundet med et kjendeligt Tab af Ammoniak.

Iltningen kan forøvrigt blive ligesaa fuldstændig, naar Pulveret sættes til den noget afkjølede Vædske; men man er da meget udsat for, at der, istedetfor de mange smaa Forpufninger, indtræder en, samlet Explosion, hvorved Kogeflaskens Indhold slynges ud af denne.

Efter Afkjøling fortyndes med et Par Dele Vand, hvorved den grønne Farve øjeblikkelig forsvinder og giver Plads for en brun, og, efter ny Afkjøling, bringes derpaa Indholdet af Kogeflasken i Destillationsapparatet, der hensigtsmæssigt kan indrettes paa følgende Maade. En rummelig Kolbe (paa $^1/_2$—1 Litr.) tjener til at optage Analysen; i Halsen passer en Kautschukprop med en skraat opadstigende Opsats (et »Næb« f. Ex., som man bruger ved Destillationer), der skal tjene til at forhindre Stænk fra at gaa over i Destillatet. Hermed er atter forbundet et lille, spiralformigt Svaleror, til hvis nederste Ende slutter sig Forlaget, der indeholder Syren, som skal optage Ammoniaken. Som Forlag anvendte jeg tidligere det almindelige Absorptionsapparat med 3 Kugler, men senere, da Erfaringen viste, at det lod sig gjøre, har jeg, hvad der er ulige bekvemmere, simpelthen anvendt en lille Kogeflaske paa omtrent $^1/_4$ Litr., som indeholder den titrerede Syre. Ved Hjælp af en dobbelt gjennemboret Kautschukprop hænger denne Flaske paa Svalerøret, som gaar omtrent midt ned i Flasken, uden dog at naa Syren. Gjennem den anden Aabning i Proppen fører et Rør umiddelbart ud i Luften. Talrige Forsøg med rene Ammonsalte have vist, at Absorptionen paa denne Maade er ligesaa fuldstændig som ved Anvendelse af Kuglerøret. Ved Benyttelse af Svalerøret foregaar der forøvrigt allerede deri en saa fuldstændig Fortætning af Ammoniaken, at man endogsaa kan lade Forlaget fra først af være tomt og tilsætte Syren efter endt Destillation, uden at lide noget kjendeligt Tab. Den nævnte Disposition er fordelagtig af den Grund, at man kan udføre Titreringen i selve Forlaget og saaledes slipper for al Omheldning og Udskylning.

Da der er en saa anselig Mængde Syre at neutralisere, maa man hertil benytte en meget stærk Natronlud, for ikke at spilde Tid, ved at skulle destillere store Rumfang af Vædske. Her have vi bestandig anvendt en Lud, der var tilberedt af 1 Del Natronhydrat og 2 Dele Vand. Den har da en Vægtfylde af omtrent 1,3, og man vil deraf behøve omtrent 40 Kub. Centimeter til Neutralisation, naar man har taget 10 Kub. Centimeter stærk Svovlsyre. Det er saaledes en ret betydelig Mængde Natron, der her gaar med, hvilket dog ikke spiller nogen Rolle, da man meget vel kan

anvende en simpel Vare, naar blot Opløsningon er godt udkogt i Forvejen, saa at den er fri for Ammoniak.

Da Destillerkolbens Indhold er en stærkt koncentreret Opløsning af svovlsurt Natron med Natron i Overskud og udskilte hydratiske Ilter, er der alle Betingelser tilstede for, at Vædsken skal støde stærkt under Kogningen. Dette sker da ogsaa med en saa overordentlig Voldsomhed, at Destillationen, naar man ikke tager Forholdsregler derimod, saa at sige umuliggjøres. Anvendelse af Platinstumper hjælper ikke meget i dette Tilfælde; saasnart det ved dem adhærerende Luftlag er kogt bort, hvad der meget snart indtræder, begynder Stødningen igjen med fornyet Livlighed, saa at Enden derpaa i Regelen bliver, at Kolben sønderslaas. Omsider fandt jeg dog et meget simpelt Middel til ganske at forebygge denne Ulempe. Man behøver nemlig blot, forinden Tilsætningen af Natron, at bringe nogle smaa Stykker Zinkblik ned i Vædsken; der vil da i den alkaliske Vædske foregaa en ringe Brintudvikling fra Zinken, og da der, som bekjendt, ingen Stødning finder Sted i Vædsker, hvori der er Luftudvikling, vil Kogningen nu foregaa aldeles roligt, selv over en meget kraftig Flamme. Først henimod Slutningen, naar Vædsken er indkogt meget stærkt, begynder Stødningen paany, rimeligvis naar Koncentrationen er bleven en saadan, at Saltet begynder at udskille sig i Varmen. Naar dette Punkt er naat, vil imidlertid ogsaa al Ammoniak forlængst være dreven over i Forlaget. Den høje Temperatur, hvorved den stærke Saltopløsning koger, bidrager i det hele taget til, at Ammoniaken drives langt hurtigere over, end ved Destillation af mere vandige Opløsninger.

Rumfanget af Vædsken i Destillerkolben vil fra Begyndelsen i Regelen være 120—150 Kub. Centimeter, hvoraf noget over Halvdelen destilleres over. Med en kraftig Gasflamme er Destillationen tilendebragt i mindre end et Kvarter. Har man flere Analyser at udføre, bør man altid have to Destillationsapparater; flere end tre vil man ikke kunne passe samtidig.

Naar Analysen og Zinken ere bragte i Destillationskolben, heldes altsaa det i Forvejen afmaalte Kvantum Natronlud hastigt ned, hvorefter Proppen uden Tøven sættes i og Lampen tændes. Forsøg med Ammonsalte have noksom vist, at man ikke behøver at frygte for, at der skal undslippe Ammoniak i det Øjeblik, hvori denne Operation staar paa, hvorfor man ikke behøver at træffe særlige og tidsspildende Foranstaltninger for Tilsætningen af Natronluden, saasom at lade denne tilflyde fra en i Destillerkolbens Prop anbragt Pipette.

At der ikke heller ved Zinkens Tilstedeværelse foranlediges noget Tab af Ammoniak, er ligeledes konstateret gjennem Kontrolforsøg[1]).

Hvad Bestemmelsen af Ammoniaken angaar, da kan man foretage denne paa hvad Maade, man maatte foretrække. Jeg kan dog ikke andet end her gjøre opmærksom paa en Methode, jeg saa godt som altid har anvendt, og som synes mig at yde særdeles meget i Retning af Bekvemhed og Nøjagtighed. Methoden er forøvrigt alt gammel og findes beskreven i Mohrs »Lehrbuch der Titriermethode«, 5te Aufl., pag. 315, men synes med Urette at være gaaet i Forglemmelse. Den beror paa den bekjendte Reaktion, at, naar man til en Blanding af jodsurt Kali og Jodkalium sætter en Syre, udskilles der efter Skemaet



$$KJO_3 + 5KJ + 3H_2SO_4 = 3K_2SO_4 + 3H_2O + 3J_2$$

en med Syremængden ækvivalent Mængde Jod, som derpaa kan titreres med svovlundersyrligt Natron. Da denne Titrering, med Stivelsevand som Indikator, som bekjendt i Skarphed næppe naas af nogen anden, kan man ogsaa paa denne Maade faa Syremængden nøjagtigere bestemt end ad nogen anden Vej. Dette gjælder dog kun ved meget stærke Syrer, som f. Ex. Svovlsyre, hvor den omtalte Reaktion øjeblikkelig indtræder i sit fulde Omfang, og det selv ved meget store Fortyndinger. Ved svage Syrer, som Eddikesyre og Mælkesyre, tager dette idetmindste meget lang Tid, om det i det hele nogensinde sker fuldstændigt.

Men af denne Titrerings Skarphed følger da atter, at man kan arbejde med meget fortyndede Normalvædsker, og deraf igjen, at man kun behøver at tage meget lidt Stof, hvilket allerede er en stor Fordel ved Forbrændingsanalyser, men ved den nye Methode næsten en Nødvendighed. Som jeg allerede tidligere har berørt, skal man nemlig anvende en betydelig Mængde Svovlsyre i Forhold til det organiske Stof, idet man allerede ved 1 Grm. heraf til 10 Kub. Centimeter Svovlsyre har ondt ved at faa det hele opløst uden Tab, og dog kan det hyppigt ved Analysen af kvælstoffattige Æmner, som Kornsorter f. Ex., være heldigt at arbejde med 1 Grm. og derover ved den sædvanlige Styrke af Normalvædskerne, for at faa et nogenlunde passende Antal Kub. Centimeter neutraliserede af den udviklede Ammoniak. Paa den anden Side er det meget ubekvemt, at skulle forøge Mængden af Svovlsyre; det vilde

[1]) Jvfr. Gmelin-Kraut: Handbuch der Chemie, 1 Bd., 2 Abth., pag. 505, L. 13 f. o. o. flg.

være heldigere, om man kunde formindske Mængden af Analysen. Nu er Syretitreringen ad den jodometriske Vej saa særdeles skarp, at man, ved Anvendelse af en Tyvendedel normal Opløsning af svovlundersyrligt Natron, aldrig er i Tvivl om en Draabe mer eller mindre. Som Følge deraf kan man ogsaa nøjes med en meget lille Mængde Stof til en Analyse. Jeg plejer at bringe 30 Kub. Centimeter Svovlsyre i Forlaget; dennes Styrke er i og for sig ligegyldig, naar blot dens Titre paa Hyposulfitopløsningen er nøjagtig bekjendt; imidlertid er det dog bekvemmest, at ogsaa Syren gjøres en Tyvendedel normal. Mængden af Analysen lader jeg da rette sig efter dens Indhold af Kvælstof, der jo i Almindelighed indenfor visse, vide Grændser vil være kjendt i Forvejen, og jeg vælger da denne Mængde saaledes, at Produktet af Kvælstofprocenten og Analysen i Gram bliver mellem 1 og 2. Den heraf dannede Ammoniak vil da kunne neutralisere mellem 14 og 28 Kub. Centimeter Syre, og, da man nu kan titrere denne med en Skarphed af $^1/_{10}$—$^1/_{20}$ Kub. Centimeter, ser man, at Nøjagtigheden ved Titreringen bliver mer end tilstrækkelig.

Paa denne Maade vil man altsaa, selv ved temmelig kvælstoffattige Stoffer, kunne nøjes med betydelig mindre end 1 Grm. til en Analyse. Ved Byg f. Ex., der i Gjennemsnit indeholder 1,5 % N, vil det være passende at afveje omtrent 0,7 Grm., ved mere koncentrerede Foderstoffer med omkring 5 % N kan man tage $^1/_4$ Grm. Kommer man op til meget kvælstofrige Æmner, som rene Æggehvidestoffer eller sligt, faar man jo rigtignok paa denne Maade lovlig lidt at veje af. Man kan da lægge mere Syre for, man kan bruge stærkere Normalvædsker, eller, da det er bekvemmest altid at arbejde med de samme, kan man afveje den firedobbelte Mængde, fylde den iltede Blanding op til 100 Kub. Centimeter og deraf udtage 25 Kub. Centimeter til Destillationen. At man omvendt ved Analysen af Stoffer, hvori Kvælstof maa siges kun at forekomme som Spor, Træ f. Ex., maa nøjes med en ringere Stofmængde, end man skulde tage efter den ovenstaaende Regel, er en Selvfølge. Selv her vil man dog, uden at gaa højere end til 1 Grm., kunne opnaa en tilfredsstillende Nøjagtighed.

Ved Udførelsen af Titreringen anvender man bedst Jodkaliumet i fast Form, da det er saa yderst let opløseligt; man kaster blot et Par smaa Krystaller ned i Vædsken. Det tungere opløselige jodsure Kali benytter man derimod helst som en Opløsning paa omtrent 4 %. Af Stivelsevandet tilbereder man sig en større Portion, som man mætter med Klornatrium, og sparer ikke der-

paa. At Titreringens Skarphed meget afhænger af dettes gode Beskaffenhed, bringes her i Erindring. Jodkaliumet bør tilsættes først, dernæst Stivelsevandet og tilsidst det jodsure Kali.

Naar den blaa Farve ved Tilsætning af den sidste Draabe Hyposulfitopløsning er forsvunden, vender den snart efter tilbage paany. Dette skyldes Indvirkningen af Luftens Kulsyre, idet en Blanding af jodsurt Kali, Jodkalium, Stivelseopløsning og rent Vand ligeledes efterhaanden farves blaa ved Henstand i Luften, medens man derimod kan holde Blandingen ufarvet, ved at lukke Flasken med en Prop, hvori der er anbragt et Absorptionsrør med Natronkalk. Denne Omstændighed volder forøvrigt slet ingen Ulempe, naar blot Titreringen ikke udføres altfor langsomt. I hvert Tilfælde er Kulsyren her til langt mindre Hinder, end Tilfældet er ved den almindelige Syretitrering med Normal-Alkali.

Beregningen af Analyserne er meget simpel, idet man blot, ved Anvendelse af en Tyvendedel normal Hyposulfitopløsning, multiplicerer de til den neutraliserede Syre svarende Kub. Centimeter med 7 (Kvælstoffets halve Ækvivalent) og dividerer det fremkomne Tal med Analysen (udtrykt i Centigrammer); man har da Procent Kvælstof. Ønsker man at undgaa den nævnte Multiplikation med 7, kunde man ogsaa anvende en $^7/_{200}$ normal Hyposulfitopløsning; man behøver da blot at dividere de nævnte Kub. Centimeter med Analysen, for at finde Kvælstofprocenten. Til yderligere Oplysning hensættes endnu et Par Exempler:

Man har en $^1/_{20}$ normal Hyposulfitopløsning. Svovlsyren, der bringes i Forlaget, er ligeledes $^1/_{20}$ normal; altsaa 30 Kub. Centimeter Svovlsyre = 30,0 Kub. Centimeter Hyposulfitopløsning.

Som Kontrolforsøg tages 0,5 Grm. rent Sukker + 10 Kub. Centimeter koncentreret Svovlsyre. Efter Destillation, med 30 Kub. Centimeter $^1/_{20}$ normal Svovlsyre i Forlaget, tage disse kun 29,8 Kub. Centimeter Hyposulfitopløsning, hvilket Tal altsaa skal bruges ved de paafølgende Analyser istedetfor 30,0.

0,645 Grm. Byg behandledes paa samme Maade. Der titreredes tilbage med 14,5 Kub. Centimeter Hyposulfitopløsning. 29,3—14,5 = 15,3 Kub. Centimeter; $\frac{15,3 \,.\, 7}{64,5} = 1,66\,\%$ N.

0,982 Grm. Træ behandledes paa samme Maade. Der titreredes tilbage med 27,3 Kub. Centimeter Hyposulfitopløsning. 29,8 — 27,3 = 2,5 Kub. Centimeter; $\frac{2,5 \,.\, 7}{98,2} = 0,18\,\%$ N.

0,440 Grm. Kasëin behandledes paa samme Maade, dog saaledes, at den iltede Blanding blev fyldt op til 100 Kub. Centimeter og

deraf blev 25 Kub. Centimeter udtaget til Destillation. Der titreredes tilbage med 5,8 Kub. Centimeter Hyposulfitopløsning. 29,8—5,8 = 24,0; $\frac{24{,}0 \,.\, 7}{44{,}0} \,.\, 4 = 15{,}3\,\%$ N.

En Fordel ved denne Titrering er det endnu, at den lader sig udføre ganske med samme Skarphed ved Lampelys, som om Dagen. Det eneste, der er at indvende imod den, er, at den stærkt fortyndede Hyposulfitopløsning er lidet holdbar. Den maa derfor jævnligt prøves, enten paa den Tiendedel normale Jodopløsning eller paa den altid uforanderlige Svovlsyre, en Prøve, som kun er et Øjebliks Sag. Naar man kjender Titren af sit faste, svovlundersyrlige Natron, er det forøvrigt gjort paa faa Minutter at tilberede en Litre frisk Opløsning.

Forøvrigt kan man, som forhen fremhævet, bestemme Ammoniaken ad hvilkensomhelst anden Vej, ogsaa som Platinsalmiak. At Platinmethoden her giver overensstemmende Resultater med Titreringen, viser, at det virkelig er Ammoniak, der er dannet ved Iltningen, og ikke forskjellige Aminer. Som en Fordel ved den nye Methode maa det her fremhæves, at man har med en ren, vandig Opløsning af Ammoniak at gjøre, hvad der meget letter Bestemmelsen, navnlig ved Titrering, i Sammenligning med Forbrændingsanalysen, hvor Vædsken i Forlaget saa ofte er farvet og uklar af forskjellige andre Forbrændingsprodukter.

Beviset for Methodens Paalidelighed har jeg søgt at tilvejebringe dels ved Analysen af forskjellige, rene Stoffer med bekjendt Indhold af Kvælstof, dels ved Undersøgelsen af en stor Mængde Stoffer af dyrisk eller vegetabilsk Oprindelse, med hvilke jeg da samtidig har udført Kontrolbestemmelser efter Will og Varrentrapps Methode. Nedenstaaende Udvalg af disse Analyser vil være tilstrækkeligt til at give et Begreb om den Nøjagtighed, man her kan vente at opnaa:

Rene Stoffer.	Bestemt efter den nye Methode.	Beregnet.
Saltsurt Triæthylamin	10,16 % N.	10,18 % N.
Asparagin	18,7 —	18,67 —
Urinsyre	33,1 —	33,3 —
Urinstof	46,6 —	46,7 —
Saltsurt Anilin	10,65 —	10,82 —
Indigotin	10,60 —	10,68 —

Rene Stoffer.	Bestemt efter den nye Methode.	Beregnet.
Hippursyre	7,75 % N.	7,82 % N.
Saltsurt Morfin	4,21 —	4,36 —
Saltsurt Kinin	7,47 —	7,77 —
Kaffëin	28,6 —	28,86 —
Blandinger.		**Fundet efter Will og Varrentrapps Methode.**
Kasëin, askefrit	15,6 % N.	15,6 % N.
Albumin af Æg, do.	15,3 —	15,6 —
Konglutin af Mandler, askeholdigt	17,5 —	17,6 —
Amygdalin	3,01 —	3,03 —
Hvide Bønner	3,20 —	3,21 —
Squarehead-Hvede	1,94 —	1,96 —
Rug	1,46 —	1,47 —
Byg	1,33 —	1,33 —
do.	1,72 —	1,71 —
do.	1,53 —	1,55 —
Extrakt af Øl	1,10 —	1,12 —
— - Urt	0,81 —	0,83 —
Tørret Gjær	10,4 —	10,6 —
Oxekjød	12,49 —	12,43 —
Wittes Pepton	13,2 —	13,2 —

En Sammenligning af de to Talrækker viser, at der er den bedste Overensstemmelse tilstede, saavel mellem det beregnede Kvælstof-Indhold i de undersøgte, rene Stoffer og det ved den nye Methode fundne, som mellem de Resultater, denne og Will og Varrentrapps Methode have givet ved de naturlige Blandinger. Kun ved enkelte Alkaloider naar man ikke det fulde Udbytte af Ammoniak; ved Morfin er der saaledes en Fejl paa 0,15 %, ved Kinin er Afvigelsen endogsaa 0,30 %, og endda er det kun efter en meget energisk Indvirkning af Svovlsyrehydrat og Fosforsyreanhydrid, at man har naat saa høje Resultater. Dette staar i Forbindelse med, hvad der pag. 15 er sagt om den stærke Binding af Kvælstoffet i Kininets Molekyl.

I Forbindelse hermed maa jeg gjøre et Par Bemærkninger om Bestemmelsen af Kvælstof i Alkaloider efter Will og Varrentrapp. Som bekjendt have Meningerne om denne Methodes Anvendelighed i dette Tilfælde været meget afvigende. I Fresenius' Zeitschrift für anal. Chemie, Bd. 4, 1865, pag. 322 findes saaledes en Afhandling af van der Burg, hvorefter man paa denne Maade skulde faa aldeles ubrugelige Resultater; i Kinin finder Forf. saaledes i forskjellige Forsøg 5,04 — 0,59 — og 2,35 % N istedetfor

8,64 % N. I 5te Bind (1866), pag. 197 af samme Tidsskrift finder man en Række Analyser af Meusel, udførte i Fresenius' Laboratorium paa de samme Stoffer og efter den samme Methode, der imidlertid i dette Tilfælde giver brugelige Resultater, 8,46 % N f. Ex. i Kinin istedetfor 8,64 % N. Da der ikke meddeles noget om Detaillerne ved Udførelsen, er det vanskeligt at klare, hvad Grunden kan være til en saadan Afvigelse. Jeg tror imidlertid at have funden, hvad der betinger, eller kan betinge, en saadan Forskjel, og mener, at denne maa søges i den Kanal, som man efter de fleste Forskrifter tilvejebringer foroven i Røret, ved at banke lidt derpaa, efter at man har fyldt det. Nu er, saavidt min Erfaring gaar, den overvejende hyppigste Grund til Fejl ved Will og Varrentrapps Methode en ufuldstændig Ammoniakdannelse, saaledes som Mulder allerede for over 20 Aar siden har fremhævet[1]), medens den Dissociation af Ammoniaken, som saa ofte senere er bleven fremdraget, næppe spiller en saa betydelig Rolle. Har man nu tilvejebragt en Kanal, stige de kvælstofholdige Luftarter og Dampe, som endnu ikke ere Ammoniak og som ikke tilbageholdes af Syren, umiddelbart op i Kanalen, uden at have passeret et kjendeligt Stykke ophedet Natronkalk, og vandre dernæst videre ad den aabne Bane og ud gjennem Absorptionsrøret. Hvilken Forskjel, der paa denne Maade kan fremkomme, ses meget slaaende af følgende 2 Parallelforsøg: Saltsurt Kinin, hvori 7,77 % N, blev forbrændt uden Kanal; Mængden af Ammoniak, bestemt ved Titrering, svarede til 7,75 %, altsaa aldeles nøjagtigt. En anden Analyse af samme Stof blev udført ganske paa samme Maade, kun at man ved et lille Slag paa Røret, før det blev lagt i Forbrændingsovnen, tilvejebragte en aaben Bane foroven i dette. Resultatet blev her kun 2,8 % N, ligesaa falskt altsaa, som i van der Burgs Analyser.

Til yderligere Sikkerhed har jeg plejet at blande lidt Sukker i den rene Natronkalk, som lægges foran i Forbrændingsrøret. Denne sintrer ellers sammen i Heden, trækker sig tilbage fra Rørets Vægge og efterlader altsaa langs med disse en rummelig Vej, saa at den egentlig ingen Nytte gjør. Efter Sukkerets Forbrænding udgjør Natronkalken derimod en porøs Masse, som fylder Røret tæt op til Væggen, og hvorigjennem altsaa al den Luft, der senere udvikles ved Analysens Forbrænding, tvinges til at passere.

---

[1]) Zeitschr. f. anal. Chemie, Bd. 1, 1862, pag. 98, efter Chem. Centralblatt, 1861, pag. 44.

At dette Spørgsmaal særlig er fremkommet for Alkaloidernes Vedkommende, ligger naturligvis i den oftere omtalte faste Kvælstof-Binding, der gjør sig gjældende ved Forbrændingen, saavel som ved Dekompositionen med Svovlsyre. Ved Æggehvidestofferne, hvor Bindingen er løsere, og hvor der derfor maaske mere umiddelbart dannes Ammoniak ved Natronkalkens Indvirkning, kan man derfor ogsaa nok opnaa rigtige Resultater med Kanalen eller trods denne.

Endnu kun et at bemærke: Naar det i det foregaaende er fremhævet, at den her udviklede Methode er anvendelig paa alle organiske Forbindelser (med et vist Forbehold overfor enkelte Alkaloider), saa er det en Selvfølge, at derfra maa undtages saadanne, som indeholde Kvælstof i flygtige Forbindelser af sur eller indifferent Karakter, altsaa som Cyanforbindelser og som Kvælstofilter. Med Hensyn til disse sidste og særlig de salpetersure Salte er der dog en ret mærkelig Iagttagelse at gjøre. Man skulde jo nemlig vente, at, naar man efter den nye Methode analyserede et Stof, der havde en Del af sit Kvælstof tilstede som salpetersurt Salt, man da vilde finde Total-Kvælstofmængden minus det, der hører til Salpetersyren, idet man maatte forudsætte, at denne ved et Par Timers Opvarmning med et stort Overskud af stærk Svovlsyre til en Temperatur, der nærmer sig Svovlsyrens Kogepunkt, maatte blive fuldstændig uddreven. Dette er dog ingenlunde Tilfældet, idet ved Tilstedeværelsen af organisk Stof endogsaa den største Del af Salpetersyren reduceres til Ammoniak. Jeg blev første Gang opmærksom herpaa, da jeg forsøgte paa at analysere salpetersurt Strychnin, der indeholder 10,6 % Total-Kvælstof, hvoraf 7,05 % falder paa Alkaloidet. Ifølge den tidligere Erfaring fra Alkaloider maatte man her altsaa vente at finde lidt under 7 %, og jeg blev derfor ikke lidet overrasket, da jeg istedet herfor fandt 10,1 %, hvilket Plus alene kunde stamme fra Salpetersyren. Jeg overtydede mig derefter om, at, medens man, ved at behandle salpetersurt Kali for sig med Svovlsyre og Permanganat, naturligvis fandt 0 Kvælstof, fik man, ved i Forvejen at tilsætte 3—4 Gange dets Vægt rent Sukker, 60—70, ja indtil 80 %, alt eftersom Ophedningen blev ledet, af Salpetersyrens Kvælstof over i Destillatet som Ammoniak. Af denne Grund er det derfor sikrere ved det pag. 10 omtalte Kontrolforsøg at tilsætte noget rent Sukker til Syren, istedetfor at tage denne alene; saafremt nemlig den anvendte Svovlsyre skulde indeholde et Spor af Kvælstofilter, vil dette ikke give sig tilkjende i et Kontrolforsøg med ublandet Svovlsyre, hvoraf Kvælstofilterne ved Opvarmningen ville uddrives,

medens disse derimod i de samtidig udførte Analyser, ved den reducerende Virkning af det organiske Stof, ville foranledige et større Udbytte af Ammoniak, end der svarer til det i den organiske Forbindelse tilstedeværende Kvælstof. Naar man derimod har tilsat et organisk, kvælstoffrit Stof i Kontrolforsøget, vil Tilstedeværelsen af Kvælstofilter ogsaa her give sig tilkjende, ved at der dannes Ammoniak.

Det er i det hele ikke let at uddrive Salpetersyren af en Blanding med organiske Forbindelser, uden at der paa samme Tid dannes Ammoniak. Dette fandt saaledes ogsaa Sted, naar man inddampede med fortyndet Svovlsyre, ja selv ved Fosforsyre blev der henimod Slutningen dannet Ammoniak, naar Blandingen opvarmedes saameget, som det var nødvendigt, for at faa Salpetersyren ud. Jeg har endelig prøvet at anvende det bekjendte Princip for Salpetersyrebestemmelse, idet jeg opløste eller opslemmede Stoffet i Vand og under Kogning tilsatte en Blanding af Jernforchlor og Saltsyre. Men selv paa denne Maade er man, naar der er meget organisk Stof tilstede i Forhold til Salpetersyren, let udsat for en lille Ammoniakdannelse.

Til Slutning vil jeg endnu under et fremhæve de Fordele, som den nye Methode navnlig forekommer mig at byde fremfor de ældre, og som synes at være betydelige nok, til at sikre dens Indførelse i Praxis. Af alle disse er da unægtelig den mest iøjnefaldende den overordentlige Besparelse i Tid, som den medfører, ligesom det ogsaa væsentlig var med dette Formaal for Øje, at jeg foresatte mig at udarbejde den. Som Exempel paa, hvad der i denne Retning kan opnaas, vil jeg blot anføre, at jeg paa en Dag, uden nogensomhelst Medhjælp, har udført 14 Analyser, et Tal, der dog ingenlunde maa anses for Maximum af, hvad der kan præsteres paa en Dag. Man vilde sikkert kunne drive det til 20 Analyser, hvis man særlig vilde indrette sig derpaa med det tilhørende Antal Gasblus og saamange Destillationsapparater, som det er muligt at passe samtidig (3). At Methoden giver paalidelige Resultater, fremgaar af Analyserne pag. 22—23, ligesom ogsaa Parallelforsøg saagodt som altid udvise en fortrinlig Overensstemmelse. Dernæst maa jeg betone de ringe Fordringer, som der her stilles til Udøverens Færdighed; medens Forbrændingsanalysen altid fordrer en øvet Kemiker, ere Haandgrebene her saa yderst simple, at man let i Løbet af meget kort Tid vil kunne indøve selv en med finere kemiske Arbejder mindre fortrolig Person saavidt, at han paa en tilfredsstillende Maade kan udføre en saadan Analyse. Fremdeles kræves her intet omstændeligt Apparat, Forbrændingsovnen

og dens Tilbehør; det hele reduceres til nogle smaa Kogeflasker og et almindeligt Destillationsapparat. Tre heldige Omstændigheder har jeg i det foregaaende paa de paagjældende Steder gjort opmærksom paa, nemlig, at man slipper for den store Findeling, at man afvejer Stoffet, hvad enten det er et Pulver eller en Opløsning, i det samme Glas, hvori den senere Behandling skal foretages, og endelig, at man til Slutning har en ren Opløsning af Ammoniak i Vand at titrere. Endelig turde det vel ogsaa have sin Betydning, hvor der forefalder mange slige Analyser, at Udgifterne ved den nye Methode ere betydelig mindre end ved de ældre; man sparer her Forbrændingsrøret og en stor Mængde Gas, idet man, istedetfor de mange, kraftige Flammer i Forbrændingsovnen, her kun brænder et lille Gasblus paa omtrent en Tommes Højde i den samme Tid. En Maaling udviste, at dette Forbrug ved 2 Timers Opvarmning med Svovlsyre var 2,6 Kubikfod; naar hertil føjes, hvad der brændes ved Destillationen, vil det samlede Gasforbrug til en Analyse dog næppe overstige 4 Kubikfod.

20

Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi.

Af

Emil Chr. Hansen.

II.

Om Askosporedannelsen hos Slægten Saccharomyces.

(Hertil 3 Tavler).

Hvad have vi hidtil vidst herom?

I 1868 offentliggjorde J. de Seynes Resultaterne af sine Dyrkningsforsøg med Mycoderma vini Desm.[1]) Tilfældigvis havde han iagttaget, at denne Art, naar den blev dyrket i Vin, som i tilstrækkelig Grad var blandet med Vand, da ikke blot var meget tilbøjelig til at danne langstrakte Celler, men at flere af disse atter i deres Indre kunde indeholde runde Celler. »Den olieagtige Plasmavædske,« siger han, »samler sig omkring smaa Kjerner i Cellens Indre, fine Granulationer optræde paa Overfladen af de herved opstaaede Legemer, og snart har en Membran udviklet sig. Modercellens Væg bliver imidlertid meget tynd og gjennemsigtig. I hver Modercelle dannes 1, 2 eller 3 af disse Endosporer. De blive frie derved, at Modercellens Væg brister.« Denne Udvikling sammenligner han med, hvad der finder Sted hos Algerne, og han bebuder at ville forfølge Spørgsmaalet hos de andre Gjærsvampe. Dette er dog ikke sket, rimeligvis fordi Reess kom ham i Forkjøbet

---

[1]) J. de Seynes, Sur le Mycoderma vini. (Comptes rendus, Tome LXVII, 1868, p. 105—109. Ann. des sc. nat. Botanique, 5 série, X, 1869, p. 5—9).

dermed. De Seynes fremhæver, at Cellerne af Mycoderma vini kun danne de omtalte Formeringsorganer, naar de dyrkes under mangelfulde Ernæringsvilkaar, hvorved deres rent vegetative Formering, Knopskydningen, hæmmes, f. Ex. i Vand eller i stærkt fortyndet Afkog af Sukker, Gummi o. s. v., og han udtaler, at hans Forsøg saaledes ogsaa staa i Overensstemmelse med, hvad der er Lov for de højere Planter.

Dette er den første Meddelelse, der i Literaturen foreligger om Sporer hos Gjærsvampe.

Omtrent samtidig hermed havde Reess i De Bary's Laboratorium og med denne berømte Botanikers Bistand begyndt at studere Saccharomyces-Arterne[1]). Ogsaa han opdagede de omtalte Sporer ved et rent Tilfælde uden egentlig at søge dem. For at erfare, om Celler af Øl-Undergjær skulde kunne udvikle en Skimmelform, bleve de udsaaede dels paa raa og dels paa kogte Skiver af Kartofler, Kaalrabi, Gulerødder o. s. v., ligeledes paa Klister, Gummiopløsning og Kjød og overhovedet paa forskjellige Næringssubstrater og derpaa dyrkede i et fugtigt Rum. I Stedet for Mycelium udviklede nogle af Cellerne imod Forventning Sporer i deres Indre. Udviklingsgangen heraf beskriver han paa følgende Maade. »Paa 5te Dagen efter Udsæden forsvinde Vakuolerne, og tæt, finkornet Protoplasma udfylder nu hele Rummet indenfor Cellevæggen. Snart optræde 2—4 rundladne Øer, som i Løbet af kort Tid omgives med en tynd Væg; denne tager til i Tykkelse, hvorimod Modercellens samtidig hermed svinder. En Modercelle med kun 1 Dattercelle hører til de sjældne Tilfælde.« Sporernes Udvikling opfatter han som fri Celledannelse, og i Følge hans Anskuelse stemmer den overens med, hvad der finder Sted hos lavtstaaende Askomyceter og da navnlig hos saadanne som Exoascus Pruni Fckl. Gjærcellens Endosporer blive derfor af ham kaldte Askosporer og Modercellen Askus. Efter at han saaledes, som han selv siger, paa en højst overraskende Maade havde fundet denne Fruktifikationsform, søgte han nu ogsaa i selve Ølbryggerierne og Gjærfabrikkerne at opdage den og komme paa Spor efter, under hvilke Betingelser den her kunde træde frem. Hans Bestræbelser i den Retning vare dog alle frugtesløse. Ved gjentagne Gange at udvaske Undergjær i et Bægerglas med saadan Forsigtighed, at han undgik en Skimmelvegetation, erholdt han derimod efter 3 Ugers Forløb en smuk Udvikling af Askosporer. Deraf slutter han,

[1]) Reess, Zur Naturgeschichte der Bierhefe, Sacch. cerevisiæ Meyen. (Botan. Zeitung, XXVII Jahrg., 1869, p. 105—118).

at denne Dannelse vil indtræde paa de Steder, hvor Gjær af en eller anden Grund er kastet hen og en Tidlang holder sig fri for Skimmel. At Sagen ikke er saa simpel, som Reess her tager den, ved Enhver, der har studeret Spørgsmaalet nøjere. Han beskriver derpaa Sporernes Spiring. Under denne udvikles der sædvanlige, knopskydende Gjærceller, men hverken Mycelium eller nogen Skimmelform.

Om Maaden, hvorpaa Forsøgene bleve udførte, fremhæves p. 113, at der ikke blev taget nogensomhelst Forsigtighedsregel for at opnaa en Renkultur. Som Standpunktet i Mykologien og Gjæringsfysiologien for Øjeblikket er, lyder denne Tilstaaelse underlig, og se vi rigtig efter Sammenhængen, hvori den staar, erfare vi endog, at der ligger en Udfordring deri. Da Reess for 14 Aar siden skrev dette, vare Forholdene imidlertid ganske anderledes end nu. Der blev da, navnlig gjennem Hallier og hans Kreds, drevet meget Uvæsen med saakaldte Renkulturer og dertil hørende Apparater, og der arbejdedes paa en aldeles kritikløs Maade. Gjærsvampe, Skimmelsvampe og Bakterier udviklede sig i vedkommende Apparat, den ene Form af den anden, man bildte sig ind at se det, og Apparatet antoges at skjærme for Vildfarelser. Saa kom den Reaktion, hvortil Reess hører; den vil i sin Iver ikke have noget med Renkulturer at bestille og begaar saa selv netop derved grove Fejl. Ville vi nemlig i vore Undersøgelser over Mikroorganismer sikre os Udgangspunkterne, saa maa vi fremfor Alt kunne adskille Formerne fra hverandre og under vort Arbejde med dem holde hver for sig i fuldstændig rene Kulturer; uden dette er ingen exakt Forskning mulig paa dette Omraade.

Da Reess bestandig arbejdede med urent Materiale, kunne vi i det Højeste kun vente, at visse Hovedtræk i hans Undersøgelser ere rigtige. Hertil hører navnlig, at han har iagttaget Askosporer hos Gjærceller og meddelt Dyrkningsmaader, ved hvilke de kunne udvikles. Men hans Iagttagelser knytte sig derimod næppe, som han selv mener, til Øl-Undergjæren; Alt viser tvertimod hen til, at han slet ikke har iagttaget Askosporer hos denne, men derimod hos en eller rimeligvis flere vilde Gjærarter.

Aaret efter udgav Reess sine samlede Studier over Alkoholgjærsvampene i en selvstændig Bog[1]). Om selve Askosporedannelsen meddeles intet Nyt af nogen Betydning. Der udtales, at den vistnok begunstiges af lave Temperaturer. Mine Under-

[1]) Reess, Botan. Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze, 1870.

søgelser have senere vist, at det Modsatte netop er Tilfældet. Om Øl-Overgjær giver han den løjerlige Meddelelse, at han kun igjennem en særegen Dyrkningsmaade opnaaede at faa dens Celler til at danne Askosporer og da endog kun meget sparsomt. I 8 Dage maatte nemlig den omtalte Overgjær dyrkes i Ølurt ved den laveste Undergjæringstemperatur, og efterat Cellerne paa denne Maade vare komne til aldeles at ligne Undergjærens, bleve de som sædvanlig udsaaede paa Gulerodsskiver, hvor meget faa af dem udviklede Askosporer aldeles af samme Art som dem, han mener at have iagttaget hos Undergjærformen af Sacch. cerevisiæ.

Ligesom i de fleste Undersøgelser, der foreligge om Saccharomyces-Arterne, mangler der ogsaa i denne fast Bund. Den typiske Overgjærs Celler ere netop i Almindelighed villige til at danne Askosporer, og hans Forsøg paa først at omdanne Overgjæren til Undergjær vare overflødige, ja kunde slet ikke føre til nogetsomhelst Resultat. Hos alle de af ham opstillede Arter med Undtagelse af Sacch. apiculatus beskriver han Askosporer og opfører i nogle Tilfælde disses Maal som Karakterer; et nøjere Studium viser imidlertid, at der slet ikke i Naturen findes saadanne Grændser, som dem Reess angiver. Dette gjælder overhovedet om de systematiske Karakterer, hvorved han mener at kunne skjelne mellem Arterne. Ogsaa hos Sacch. Mycoderma (Mycoderma vini Desm.) meddeler han ligesom J. de Seynes at have iagttaget Sporer.

Eidam var den Første, som drog Rigtigheden af de foregaaende Meddelelser i Tvivl[1]). Han siger herom, at saavel han selv som Andre bestandig med negativt Resultat have forsøgt efter Reess's Methode at fremstille disse Dannelser, og han antager, at Aarsagen hertil muligvis kunde søges deri, at Sporerne kun udvikle sig paa en bestemt Aarstid.

J. de Seynes's og Reess's Opdagelse havde, som rimeligt var, vakt megen Opmærksomhed, og allerede i 1872 udkom der fra fransk Side et større Arbejde over det samme Emne, nemlig af Engel[2]). Heri meddeles en forbedret Methode til Udviklingen af de ofte omtalte Sporer. Gjærcellerne udsaas paa den glatte Overflade af en Gibsblok, der derpaa anbringes i et Glas med Vand saaledes, at Overfladen med vedkommende Gjær holdes jævnt fugtig, og Glasset dækkes derefter med en Glasplade eller paa anden Maade. Forøvrigt giver dette Skrift ingen Oplysning af

[1]) Eidam, Der gegenwärtige Standpunkt der Mycologie, 1871, p. 30, zweite Auflage, 1872, p. 59—60.

[2]) Engel, Les ferments alcooliques, 1872.

Betydning. Paa flere Steder indeholder det kun en tankeløs Gjentagelse af Reess's Resultater, og hvor Engel kritiserer denne, er han i Regelen uheldig. Om Sacch. apiculatus meddeler han, at han hos denne har opdaget en ny Fruktifikationsform, hvorved den skulde faa en vis Lighed med Protomyces macrosporus. Skjøndt han selv erkjender, at han ikke fik sine Forsøg i den nævnte Retning gjennemførte, er han dog saa dristig paa Grund af den nye Fruktifikationsform, som han mener maa være tilstede hos denne Art, at opføre den som Repræsentant for en ny Slægt, Carpozyma.

I en tidligere Afhandling[1]) har jeg allerede udtalt, at Engel's Meddelelse beror paa en Vildfarelse, og kan nu endvidere tilføje, at jeg ved senere atter og atter at gjentage og variere hans Forsøg er kommen til det bestemte Resultat, at Sacch. apiculatus ikke danner de af Engel beskrevne Fruktifikationsorganer. Arbejder man paa en unøjagtig Maade, som Engel har gjort, saa kan man vel i sine Gibsblok-Kulturer af og til finde Legemer, der ligne den af ham afbildede Protomyces-Fruktifikation, og disse optræde ikke blot i Dyrkningsforsøgene med den nævnte Saccharomyces-Art, men ere en ligesaa hyppig, udenfra kommende Indblanding ved Forsøgene med de andre Arter. Holdes Kulturerne derimod fuldstændig rene, saa optræde de ikke. Jeg har hidtil forgjæves forsøgt at bestemme, hvortil de høre, men at de ikke ere Udviklingstrin af Sacch. apiculatus er i Følge Ovenstaaende bevist. Engel's ny opstillede Slægt kan derfor ikke godkjendes. Et andet Spørgsmaal er det, om den lille citronformede Gjærsvamp, der ikke som de andre, til Slægten Saccharomyces hørende Arter danner Askosporer, med Rette kan stilles sammen med disse under en og samme Slægt. Det er imidlertid urigtigt at forøge Systematikens allerede overordentlig store Registre med nye Navne uden tvingende Nødvendighed, og en saadan er ikke endnu tilstede. Vor Viden om Saccharomyces-Arterne er i Øjeblikket alt for ringe til, at vi formaa at drage Grændserne. Den citronformede Gjærsvamp skal derfor indtil videre beholde sit gamle Navn, Sacch. apiculatus.

Af det Foregaaende erindres det, at J. de Seynes betegner Sporerne efter deres Dannelsesmaade som Endosporer og ikke som

---

[1]) Emil Chr. Hansen, Ueber Saccharomyces apiculatus. (Hedwigia, 1880, p. 75) og navnlig: Om Saccharomyces apiculatus og dens Kredsløb i den frie Natur. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet. I B 1881, p. 313).

Reess indlod sig i nogen Drøftelse af, hvilken systematisk Plads, Slægten Saccharomyces i Følge den ny opdagede Fruktifikationsform maatte indtage. Paa samme Maade har Cienkowski i sine Studier over Mycoderma vini[1]) forholdt sig, ogsaa han kalder Sporerne, som han troer at have iagttaget hos denne Art, for Endosporer, men i Modsætning til de foregaaende Forskere mener han, at de ikke opstaa ved fri Celledannelse, men ved en Deling af hele Cellens Indhold. »Naar Cellerne forberede sig til Udvikling af Endosporer,« siger han, »bliver Indholdet tættere, og derpaa deler det sig i fire, i en Række liggende Skiver eller i ligesaa mange kileformede Partier.« (Hans Tab. II, Fig. 36. c. d. e.). I hans citerede Figurer ses der Antydning af Vægge, der ere i Færd med at udvikle sig, og der er næppe nogen Tvivl om, at han her har havt de Dannelser for sig, som jeg i mine efterfølgende Undersøgelser kalder Skillevægdannelser. (Se mine Fig. 1—5a). Disse ere imidlertid forskjellige fra den egentlige Askosporedannelse; denne foregaaer hovedsagelig saaledes, som Reess har beskrevet den.

Imod den af Reess givne Tydning af Saccharomyces-Sporernes morfologiske Betydning rejste Brefeld et Angreb[2]). Han opfatter Saccharomyces-Arterne som nær beslægtede med Mucor racemosus. »Naar Gjærcellen,« siger han, »befinder sig udenfor sin Næringsvædske og er udsat for Luftens direkte Paavirkning, udvikler den sig til et lille Sporangium med nogle faa Sporer, paa samme Maade som det sker med »Gemmedannelsen« hos den nævnte Mucor, naar den kommer i Berøring med Luften. Sporangiet hos denne er mere kompliceret bygget, og denne større Komplikation i Bygningen svarer til den højere Udvikling, som Mucor har opnaaet i Sammenligning med Saccharomyces.« Som Asci, mener han, kunne kun saadanne Celler opfattes, der ikke blot i deres Indre danne Sporer, men som tillige have udviklet sig af den kjønsløse anden Generation, der er fremgaaet af et befrugtet Askogon. Da der imidlertid hos Gjærceller hverken findes Askogon eller Kjønsakt overhovedet, slutter Brefeld ydermere heraf, at Saccharomyces-Arterne ikke kunne henregnes til Askomyceterne. Paa den Tid, han skrev dette, var der noget Berettiget i denne Betragtningsmaade; thi man antog den Gang, at der hos Askomyceterne overhovedet maatte findes de hos nogle faa Arter fornylig opdagede Kjøns-

---

[1]) Cienkowski, Die Pilze der Kahmhaut. (Petersborg Akademiets Bulletins, T. XVII, 1873).

[2]) Brefeld, Mucor racemosus und Hefe. (Flora, 56 Jahrg. 1873, p. 385—399).

organer. I Øjeblikket synes Forskningen derimod at have bevist, at der ogsaa iblandt fuldstændig typiske, højt udviklede Askomyceter findes et større Antal, hos hvilke Kjønsorganer aldeles mangle. Brefeld's Indvendinger have altsaa mistet den Gyldighed, som de tidligere tildels havde, og hvad den af ham fremførte nye Tydning angaar, ja, saa kan det Samme siges om den som om mange af de Systemer, hvorpaa Morfologien er saa overvættes rig: den er egentlig hverken bedre eller daarligere end den gamle. Der er Grunde, som tale for begge, men ikke saadanne, som give en sikker Afgjørelse til den ene eller anden Side, Spørgsmaalet er endnu bestandig flydende, og det vil ikke være vanskeligt ved Siden af Reess og Brefeld at opstille en tredie, ligesaa rimelig Tydning som disses. Foreløbig holde vi altsaa fast ved Reess's morfologiske Betragtningsmaade, da den har Aldersprioriteten, og opfatte Saccharomyces-Arterne som lavtstaaende Ascomyceter.

Reess anmeldte ovenstaaende Afhandling i Botan. Zeitung 1873, p. 777, og knyttede som Forsvar mod Angrebene nogle Bemærkninger hertil. Disse bragde imidlertid ingen virkelig Oplysning og viste kun, at han følte sig usikker.

Det var ikke blot i den botaniske Verden, at Reess's Bog med Iver blev studeret, men en ikke ringere Opmærksomhed blev ogsaa skjænket den af Gjæringsteknikerne. Tidsskrifterne for Gjæringsindustriens forskjellige Grene bære paa den Tid talrige Vidnesbyrd derom. Som oftest vare imidlertid de her offentliggjorte nye Bidrag, som Reess's Undersøgelser havde fremkaldt, ubetydelige og ikke sjælden aldeles værdiløse. I Blankenhorn's og Morits's Afhandling[1]) findes dog for første Gang den Oplysning, at en Gjærcelle ogsaa kan danne et større Antal Askosporer end 4; der beskrives og afbildes nemlig Celler hver med 5. Rigtigheden af denne Iagttagelse bekræftede David[2]), og han meddelte tillige, at man paa selve Objektglasset kan dyrke Gjærceller saaledes, at de udvikle Askosporer. Han anbragde vedkommende Gjærcelle paa dette i en Draabe Vand, som han derpaa dækkede med et Dækglas, og satte det Hele ind i et fugtigt Rum. Efter tre Døgns Forløb var der dannet Askosporer.

Reess havde ikke havt Lejlighed til nærmere at studere Brændevinsgjæren (Pressegjær), og en af Wiesner's Elever, Schu-

---

[1]) Blankenhorn und Moritz, Unters. über den Einfluss der Temperatur auf die Gährung. (Annalen der Oenologie, 3 B. 1873, p. 11).

[2]) David, Ueber Rothweingährungspilze. (Annalen der Oenologie, 4 B. 1874, p. 223).

macher, foretog derfor Undersøgelser i den Retning[1]). Det viste sig, at Pressegjærcellerne ogsaa formaa at udvikle Askosporer, og ene paa Grund heraf drager han nu uden videre den Slutning, at denne Gjærform maa være en Kulturform af Sacch. cerevisiæ. Af hans Maade at slutte paa vilde følge, at alle de andre af Reess opstillede askosporedannende Arter ligeledes maatte henføres til denne ene Art. Ligesom de Foregaaende arbejdede ogsaa Schumacher med urent Materiale; flere af de forunderlige Angivelser i hans Afhandling finde heri deres naturlige Forklaring.

En ny Fremgangsmaade, ved hvilken Askosporerne ligeledes skulle kunne dannes, angives af Müntz[2]). Ved nogle kemiske fysiologiske Experimenter, som han i andet Øjemed anstillede med forskjellige Svampe, ledede han en Iltstrøm gjennem en Glykoseopløsning, hvori han dyrkede Ølgjær; de fleste af dennes Celler dannede herved Sporer. Jeg har en Gang foretaget nogle lignende Forsøg, men disse viste alle hen til, at Behandlingen med Ilt ingen Indflydelse havde. Undergjær af Sacch. cerevisiæ og en af de vilde Gjærarter, som høre til Gruppen Sacch. Pastorianus, bleve hver for sig anbragte dels i steriliseret Urt og dels i steriliseret Vand, og igjennem disse Vædsker blev der ledet en langsomt boblende Iltstrøm, i en Forsøgsrække i Løbet af 5 Timer, og i en anden i 1½ Time. Askosporer optraadte imidlertid ikke, ejheller efterat Vandkulturerne havde staaet 15 Døgn, og Gjæren i den Tid var bleven udvasket, som Reess angiver det, dog var den sidstnævnte Gjærart ellers meget villig til at danne disse Formeringsorganer. Samme to Gjærarter bleve ogsaa efter Engel's Methode udsaaede paa Gibsblokke og her samtidig med Forsøgene i Vædskerne udsatte for Iltens Paavirkning, men ligeledes uden kjendelig Indvirkning. Askosporerne optraadte som de plejede, hverken før eller senere; sparsomt og langsomt paa Blokkene med Undergjærformen af Sacch. cerevisiæ, rigeligt og forholdsvis hurtigt paa Blokkene med den vilde Gjærart.

I 1875 offentliggjorde Brefeld en Række biologiske Iagttagelser[3]), som paa Grund af den livlige, opsigtvækkende Form, hvori

---

[1]) Schumacher, Beiträge zur Morphologie und Biologie der Hefe. (Aus dem LXX. Bande der Sitzb. der k. Akad. der Wissensch. in Wien. I. Abth. Juni-Heft. Jahrg. 1874).

[2]) Müntz, Recherches sur les fonctions des champignons. (Comptes rendus hebd. des séances de l'Acad. des Sciences 1875, T. 80, p. 178—181. Citeret efter Botan. Jahresbericht. 3 Jahrg. p. 171).

[3]) Brefeld, Beobachtungen über die Biologie der Hefe. (Sitzungsber.

de bleve meddelte, og paa Grund af de overraskende Nyheder, som de bragde, bleve grebne med stor Interesse og hurtig overførte i Læreboger og populære Skrifter. Brefeld meddeler, at de ere Frugten af flere Aars fortsatte Studier. Hans Hypothese om Gjærsvampenes Kredsløb i Naturen har jeg imødegaaet i min foran omtalte Afhandling om Sacch. apiculatus, og af mine efterfølgende Undersogelser ville Læserne efterhaanden kunne erfare, at hans Arbejde overhovedet ikke kan taale en kritisk Prøve. I nærværende Afhandling skal kun tales om, hvad der angaar Askosporerne hos Saccharomyces-Arterne. I Løbet af 2 Aar forsogte Brefeld forgjæves efter Reess's Methode at bringe Celler af Kulturgjær (Ol-Over- og Undergjær samt Pressegjær) til at udvikle disse Fruktifikationsorganer.

»Det gjaldt nu,« siger han, »om at finde en naturlig Forklaring, og en Ledetraad blev da den Tanke, at den mangeaarige Kultur kunde have udøvet en skadelig Indflydelse paa denne Udvikling. Den dyrkede Gjær har nemlig under de i Industrien herskende Forhold ikke Lejlighed til at fruktificere, men forplanter sig udelukkende ved vegetativ Formering.« Ved at anbringe Celler af vild Gjær fra Vindruer paa Objektglas, som han derpaa hensatte i et fugtigt Rum, opnaaede han imidlertid bestandig allerede efter 24 Timers Forløb en rig Udvikling af Askosporer. De paa samme Tid anstillede Prover med Kulturgjær bleve imidlertid ogsaa efter denne Fremgangsmaade frugteslose. »Disse Forsøg,« mener han, »vise paa den skjønneste Maade, hvilken Forskjel der i Henseende til Fruktifikationen findes imellem den vilde, naturlige Gjær og Kulturgjæren, og da Aarsagen til denne Forskjel udelukkende maa søges i den Indflydelse, som Kulturen paa den ene Side har udovet, saa følger heraf, at Naturracerne under Dyrkningen efterhaanden have mistet den Evne til at danne Fruktifikationsredskaber, som er ejendommelig for Stamformen. Aarsagen til, at de have tabt denne Evne, som de en Gang besade, kan næppe være nogen anden end den, at de i Industriens Tjeneste ere tvungne til kun at formere sig ad vegetativ Vej ved Knopskydning.«

Han angriber Reess's Methoder og fremhæver Dyrkningen paa Objektglasset som meget bedre. At David allerede tidligere har givet Oplysning herom, omtaler han ikke. Engels Arbejde synes ogsaa at være ham aldeles ubekjendt; han tager i hvert Fald ikke Hensyn dertil. Den morfologiske Tydning at Gjærcellens Frukti-

der Gesellschaft naturforschender Freunde zu Berlin. 16 März 1875. Botan. Zeitung 1875 p. 401).

fikation, som han for et Aar siden havde publiceret i Tidsskriftet Flora, gjentager han ogsaa her tilligemed de i den Anledning rettede Angreb paa Reess.

Brefeld's i det Foregaaende omtalte Theori er aldeles uholdbar. Jeg har nemlig med Sikkerhed paavist, at ikke blot vild Gjær men ogsaa Kulturgjær udvikler Askosporer. En rigelig og kraftig Formering i den nævnte Retning erholdt jeg endog med Lethed ikke blot af Overgjær (Sacch. cerevisiæ) fra kjøbenhavnske Brænderier og Pressegjærfabrikker, fra Forsøgsstationens Brænderi i Biesdorf, fra Helbing's Brænderi i Wandsbek og fra Mautner's Gjærfabrik i Wien, men tillige af den kraftige og typiske Overgjær, som i umindelige Tider har været dyrket i Edinburgh's Bryggerier. Sidstnævnte Gjær maa tilmed netop anses som et udmærket Exempel paa en rigtig gammel Kulturgjær. Overgjæringen paa de britiske Øer hører nemlig i Følge alle Efterretninger til den ældste Gjæringsindustri, vi kjende. Medens paa Fastlandet Undergjæringen efterhaanden har fortrængt den gamle Overgjæring i Bryggerierne, har den nemlig der indtil den nyeste Tid endog holdt sig som eneraadende. Ogsaa Øl-Undergjær, fandt jeg, formaar at udvikle Askosporer omend mindre villig end de foran omtalte Gjærformer. Det er følgelig slaaet fast, at Kulturgjær ligesaa godt som vild Gjær kan danne Askosporer. Paa den anden Side kan det ogsaa fremhæves, at jeg nu i henved tre Aar har dyrket Gjærsvampe af Gruppen Pastorianus i Urt i Carlsberg Laboratorium og i den Tid ved Knopskydning avlet endeløse Generationer, uden at det har været mig muligt at opdage Spor af Svækkelse i deres Evne til at danne disse Formeringsorganer, og jeg havde dog min Opmærksomhed særlig henvendt derpaa.

Brefeld foretog en længere Række Forsøg saavel med sædvanlige vegetative Gjærceller som med Sporerne for at erfare i hvilken Grad, de kunne taale Udtørring. Med en Vanddraabe bleve de anbragte paa Objektglasset og her overladte til Indtørringen. De vegetative Celler af Kulturgjæren havde allerede mistet deres Spireevne efter 14 Dages, den vilde Gjærs Celler derimod først efter 4 Ugers Forløb, og sidstnævntes Askosporer bevarede endog deres Livskraft i flere Maaneder. I disse Forsøg savne vi Oplysninger om den Tilstand, i hvilken Cellerne vare, da de bleve anbragte paa Objektglasset, om Forsøgene f. Ex. bleve gjorte med unge, kraftige Celler eller med gamle, med Celler avlede under samme eller under forskjellige Vilkaar. Vi savne endvidere navnlig Oplysninger om Temperaturforholdene, og disse spille her en meget stor Rolle, større end Brefeld vistnok har

tænkt sig. Medtagne Gjærceller, som ikke ved Værelsets vexlende Temperatur kunne komme til Live endog i den gunstigste Næringsvædske, formaa det, naar de under lignende Forhold udsættes for en nogenlunde konstant Temperatur af c. 27° C. Antage vi, at Brefeld i hvert Fald har anstillet sine Forsøg saaledes, at de kunne sammenlignes indbyrdes, saa have vi, omend ikke absolute dog relative Størrelser, som have deres Interesse. Betænkelighederne og Spørgsmaalene komme imidlertid dog atter frem overfor de to Rubriker, hvormed han opererer: Er al Kulturgjær virkelig det Samme? Er der ingen Forskjel paa vild Gjær? Skjules der ikke under disse Navne hver for sig forskjelligartede Racer eller Arter med forskjellige fysiologiske Ejendommeligheder?

Om Gjær, som i nogenlunde tykke Lag er lufttørret, vide vi gjennem flere Forskeres overensstemmende Forsøg, at de vegetative Celler deri i flere Maaneder kunne bevare deres Livskraft. Forholdene ere imidlertid her, maa vi erindre, anderledes end i Brefeld's Experimenter, hvor de indtørrede Celler udsættes for Luftens direkte Paavirkning i overordentlig tynde Lag.

Alle de i det Foregaaende omtalte Iagttagelser og Betragtninger findes ligeledes i en større Afhandling, som Brefeld samme Aar udgav i Landwirthschaftl. Jahrbücher[1]). Han havde særlig sin Opmærksomhed henvendt paa Exkrementerne; her fandt han Former, der af ham antages at staa de egentlige Alkoholgjærsvampe nær, men som navnlig skulde afvige fra disse i Henseende til Fruktifikationen. Han forudsætter, at Saccharomyces-Formerne kun kunne danne højst 4 Askosporer i hver Celle, og her fandt han Celler, der havde udviklet 10. Gives der ikke andre virkelig adskillende Karakterer, saa kunne Brefeld's nye Former dog godt høre til den nævnte Slægt. Jeg har nemlig paavist, at Arter af Gruppen Sacch. Pastorianus ere tilbøjelige til at danne flere end 4 Askosporer i en Celle, og ved en bestemt Dyrkningsmaade har jeg kunnet fremskynde denne Tilbøjelighed, saa at flere af Cellerne hver udviklede endog 5—10 Askosporer.

I den næste Afhandling om Gjæringsorganismer, som han udgav 1876[2]), findes der ligeledes kun nogle faa Meddelelser, der vedrøre vort nuværende Spørgsmaal. Hertil hører f. Ex. den Oplysning,

---

1) Brefeld, Ueber Gährung. II. (Landwirthschaftl. Jahrb. IV B. 1875, p. 405—433.).

2) Brefeld, Ueber Gährung. III. (Landwirthschaftl. Jahrb. V B. 1876, p. 281—343).

at Mycoderma vini Desm. ikke i Brefeld's Kulturforsøg udviklede Askosporer, uagtet han anvendte megen Umage paa at bringe den dertil. Dette Resultat gaar saaledes imod de tidligere Meddelelser fra J. de Seynes, Reess, Engel og Cienkowski. Her kan det være passende at minde om, at disse Forskere vel mene at have fundet Askosporer hos den nævnte Art, men at Ingen iagttog disses Spiring. Engels Figurer ere iøvrigt ikke skikkede til at bibringe den kritiske Læser den Overbevisning, at han virkelig har iagttaget Askosporedannelsen, thi de vise snarest hen til, at han har ladet sig skuffe af de fedtagtige Legemer, der saa hyppigt optræde hos denne Art og netop under de Dyrkningsforhold, der bleve anvendte for at fremkalde en Udvikling af Askosporerne. I min Doktordisputats »Organismer i Øl og Ølurt« har jeg p. 22 omtalt dem. Jeg haaber i et senere Arbejde at kunne give Bidrag til Løsningen af dette og andre Spørgsmaal vedrørende Mycoderma vini.

Ligesaa lidet som i de foregaaende Afhandlinger udtaler Brefeld sig her med Tydelighed, om hans Naturgjær, Vingjær eller vilde Gjær er en eller flere Arter. Efter nøje og gjentagne Gange at have studeret alle hans Arbejder, har jeg dog nærmest faaet det Indtryk, at han er tilbøjelig til at opfatte al Naturgjær som een Art og som Stamformen, hvoraf der ved Dyrkning er opstaaet forskjellige Varieteter af Kulturgjær. Paa Tavle II i hans sidst citerede Afhandling har han givet en Række Figurer af Vingjærcellernes Askosporer og af disses Spiring. I Beskrivelsen gjør han opmærksom paa, at Gjærcellernes Form og Størrelse er meget variabel, og at Sporernes Størrelseforhold ejheller have systematisk Værdi, og han betegner Reess's systematiske Bygning som et primitivt og forfejlet Forsøg. Saavel i denne som i den foregaaende Afhandling fremhæver han paa flere Steder stærkt, hvilken vigtig Opgave det er at studere Gjærformerne, men tillige hvor overordentlig vanskeligt det er paa dette Omraade at skaffe sig virkelige Renkulturer og dernæst at prøve Formernes fysiologiske og morfologiske Ejendommeligheder. Han bebuder i den Retning nye Undersøgelser; men de ere ikke udkomne.

Efter Tidsfølgen komme vi dernæst til Pasteur's berømte Bog om Øllet og dets Sygdomme. I de meget udførlige Meddelelser, som her ere givne om Saccharomyces-Arterne, finde vi mærkelig nok ikke en eneste Undersøgelse over Askosporedannelsen. Paa de Steder i Bogen, hvor Talen er herom, henvises nemlig kun til J. de Seynes, Reess og Engel[1]).

---

[1]) Pasteur, Études sur la bière, 1876. p. 148 og 170.

Det blev foran berørt, at der kunde være nogen Tvivl om, hvorvidt Saccharomyces Mycoderma udvikler Askosporer eller ej. I dette Spørgsmaal har Pathologen Grawitz[1]) sluttet sig til de Forskere, der paastaa, at de have iagttaget Askosporer hos den nævnte Art. Han kalder dem »Dauersporen« og beskriver, hvorledes de udvikle sig i Mycoderma vini-Koloniernes Sideknopper; ligeledes meddeler han at have iagttaget, at de spire med gjærsvampelignende Knopper. For Grawitz er den ovennævnte Art identisk med Oidium albicans eller Trøskesvampen.

Imod Rigtigheden af denne Opfattelse har Reess rejst begrundede Indvendinger, og han har tillige fremhævet, at den virkelige Trøskesvamp ikke danner Askosporer[2]). Vi staa altsaa her atter overfor det Usikre; Opfattelserne svinge frem og tilbage.

Medens de foregaaende Forfattere trods den Uoverensstemmelse, der paa flere Punkter findes i deres Meddelelser, dog alle ere enige i at opfatte Askosporerne hos Gjærcellerne som normale Formeringsorganer, traadte den franske Botaniker van Tieghem op med en hel anden og meget pikant Tydning[3]), der ved det pirrende Nye deri absolut maatte vække Opmærksomhed. Askosporedannelsen antages af ham at skyldes en Sygdomstilstand, hvori Protoplasmaet skulde indtræde derved, at vedkommende Celle udenfra bliver angreben af Bakterier. De Dele af Protoplasmaet, der ere nærmest Angrebspunkterne, antages at blive tilintetgjorte, medens derimod det Øvrige trækker sig tilbage, isolerer sig i Partier, som derpaa afrundes og endelig tilsidst omgive sig med en Væg, hvormed da Askosporerne ere færdige. Jeg har underkastet Spørgsmaalet en experimental Prøve, som nærmere beskrives i det Følgende; den har vist, at van Tieghem's Opfattelse er aldeles greben ud af Luften.

I 1880 indførte Wiesner Undersøgelserne over Askosporedannelsen hos Gjærceller som et nyt Led i den tekniske Varekundskab[4]);

---

[1]) Grawitz, Beiträge zur systemat. Botanik der pflanzlichen Parasiten mit experimentellen Untersuchungen über die durch sie bedingten Krankheiten. (Virchow's-Archiv, 70 B. 1877, p. 546—598).

[2]) Reess, Ueber den Soorpilz. (Sitzungsbericht der physikalisch-medicinischen Societät zu Erlangen. Sitzung vom 9 Juli 1877. Botan. Zeitung 1878, p. 201).

[3]) Ph. van Tieghem, Troisième Mémoire sur Les Mucorinées. (Extrait des ann. des sc. nat. Botanique, 6 série, IV, 1878, p. 9).

[4]) Bedeutung der technischen Rohstofflehre (techn. Waarenkunde) als selbstständiger Disciplin und über deren Behandlung als Lehrgegen-

han mente, at han herved havde opdaget et Middel til at prøve, om Pressegjær var forfalsket med Ølgjær eller ej. »Jeg har overtydet mig om,« siger han, »at Pressegjæren, som den gaar i Handelen ogsaa undertiden er forfalsket med Ølgjær. En saadan Tilsætning betaler sig aabenbart kun, naar der benyttes større Mængder af Forfalskningsmidlet; men derved faar Pressegjæren en brunladen Farve, og denne maa atter skaffes bort ved Tilsætning af Stivelse. Kjøberne forurettes altsaa i høj Grad ved Forfalskningen. Man staar imidlertid temmelig magtesløs overfor dette Bedrageri. Den mikroskopiske Undersøgelse hjælper Intet; thi Pressegjærens (Brændevinsgjærens) Celler kunne ikke direkte skjelnes fra Ølgjærens, og da der desuden til Forfalskningen kun anvendes meget ren Ølgjær, som er temmelig fri for Humlebestanddele, saa har man ejheller megen Udsigt til ved Hjælp af disse at komme paa Spor efter Sammenhængen. Jeg har nu udfundet en Methode, ved hvilken man kan paavise denne Forfalskning. Det er opdaget af Reess, at Gjærcellerne under Vegetationsbetingelser, der passe for Udviklingen af Skimmelsvampe, kunne i deres Indre danne flere, i Almindelighed fire Celler, de saakaldte Askosporer. Jeg har for første Gang gjort den Iagttagelse, at Pressegjærens Celler ikke formaa at udvikle disse, og senere blev der af E. Schumacher i mit Laboratorium og derpaa af den udmærkede Mykolog Brefeld leveret Beviser for, at Askosporedannelsen slet ikke forekommer hos Brændevinsgjæren, men at Formeringen af dennes Celler udelukkende foregaar ved Knopskydning. Herved adskiller den sig fra Ølgjæren, og man har saaledes et Middel til at paavise, om der i en forelagt Prøve Pressegjær findes Ølgjær eller ej. Man udbreder i et tyndt Lag den Gjær, der skal undersøges, paa Skiver af Rugbrød, kogte Kartofler eller Gulerødder og lader det Hele henstaa i et absolut fugtigt Rum ved en Middeltemperatur. Hvis der virkelig er Ølgjær tilstede, vil man da efter nogle Dages Forløb ved Hjælp af Mikroskopet finde Askosporer.«

Saadanne Meddelelser ere ikke skikkede til at forøge Praktikernes Agtelse for videnskabelige Forskningers Betydning. For det Første er, som vi allerede af mine foregaaende Bemærkninger kunne lære, Wiesner's Meddelelse om, at Pressegjær ikke skulde kunne danne Askosporer, aldeles urigtig. Alle de af mig undersøgte Prøver af Pressegjær have været ligesaa villige til at danne

stand an techn. Hochschulen, von Dr. Jul. Wiesner, Prof. an der Wiener Universität. (Dingler's Polytechnisches Journal. 237 B. Jahrg. 1880, p. 407 und folg.).

Askosporer som Ølovergjær og endog meget villigere end Ølundergjæren; jeg har jo endog gjentagne Gange gjort Forsøgene med Pressegjær fra selve Wien, nemlig fra Mautner's berømte Fabrik. Dernæst har Wiesner paa en mærkelig Maade rent misforstaaet, hvad Brefeld og hans egen Discipel Schumacher skrev. Den Første mener, som ovenfor anført, at al Kulturgjær, ogsaa Ølgjær, har tabt Evnen til at danne denne Fruktifikation, og sidstnævnte meddeler jo netop, at Pressegjæren formaar at udvikle den. Her kan der ligeledes passende erindres om, at der i Pressegjæren som Regel altid forekommer en større eller mindre Indblanding af vild Gjær, og om dennes Celler fremhæver jo netop Brefeld, at de med Lethed udvikle Askosporer. Der er altsaa ingen af de to Forfattere, der støtter Wiesner's Opfattelse.

Urigtige Methoder og vildledende Meddelelser kunne navnlig paa dette Omraade stifte megen Skade og dobbelt, naar de komme frem under en berømt Videnskabsmands Autoritet. De blive da i Almindelighed tagne som Troessætninger og sætte sig ofte i længere Tid fast i de tekniske Laboratorier. Disse kunne jo ogsaa umuligt ved selvstændige Undersøgelser prøve Alt, hvad der kommer frem, dertil bevæge deres Arbejder sig paa et altfor stort og forskjelligartet Omraade. Det kan næppe undgaas, at der i Stridsspørgsmaal, om en Forfalskning har fundet Sted eller ej, gives Erklæringer, som i god Tro ene støtte sig til saadanne Analyser som de foran berørte. Hvilken Uret og Forvirring, der under saadanne Forhold kan opstaa, er af sig selv indlysende. Med disse Betragtninger skrinlægges saa Wiesner's nye tekniske Methode.

Der er endnu et Arbejde at undersøge i denne kuriøse Kjæde af Modsigelser og ofte løse Angivelser, som jeg fra de sidst forløbne femten Aars Historie har draget frem til kritisk Belysning. Dette Arbejde skyldes Kern[1]) og handler om den i Kaukasus ved Gjæring af Komælk tilberedte Drik Kephir[1]). Gjærcellerne, som ere virksomme herved, henfører han til Sacch. cerevisiæ, og da det er en Kulturform, finder han det i sin Orden, at det ikke lykkedes for ham at faa den til at udvikle Askosporer.

Spørge vi til Slutningen om, hvilke sikre Resultater de undersøgte Arbejder have bragt, saa se vi, at de egentlig

---

[1]) Kern, Ueber ein Milchferment des Kaukasus. (Botan. Zeit. XL. 1882, p. 264 og Biolog. Centralblatt 1882. 1 Maj).

indskrænke sig til de Oplysninger, som navnlig skyldes Reess, nemlig at Arter af Slægten Saccharomyces under visse, endnu overfladisk kjendte Vilkaar, kunne danne endogene Celler, og at disse i passende Næringsvædsker udvikle sig til vegetative Celler med Knopskydning.

Forøvrigt strides der frem og tilbage, uden at en bestemt Afgjørelse til den ene eller anden Side opnaas, thi de exakte Methoder, som ene kunde have ført hertil, manglede.

Undersøgelserne over Askosporerne staa i nøje Forbindelse med det fundamentale Spørgsmaal om Begrændsningen af Saccharomyces-Arterne, et Spørgsmaal, der er af den største Betydning saavel for Gjæringstekniken som for Fysiologien. For Praktikerne har Sagen to Sider: Kunne disse forskjellige Arter, som siges at være tilstede, tages i planmæssig Kultur og tvinges til at give os Produkter med andre og bedre Egenskaber end de, vore nuværende have? Eller: Gribe de vilde Gjærarter forstyrrende ind i den Drift, vi nu føre? Og hvorledes skulle vi da værge os imod dem? Men i alle Tilfælde er der det samme vigtige Spørgsmaal: Hvorledes skulle vi faa fat paa dem for at underkaste dem en Prøve, og hvorpaa kunne vi kjende dem?

De Forskere, der siden Udgivelsen af Reess's systematiske Arbejde have anstillet experimentelle fysiologiske Undersøgelser med Alkoholgjærsvampene, have vel i Regelen set, at der ogsaa til dem forelaa saadanne ubehagelige Spørgsmaal, men de have da skudt dem tilside, stolende paa, at man vel kunde komme igjennem uden at tage Hensyn dertil. Al Kulturgjær blev raskvæk taget under Et som Sacch. cerevisiæ. I Experimenterne blev der i det Højeste kun skjelnet mellem Over- og Undergjær. Men om den ene var lidt forurenet af den anden, eller om der i Kulturgjæren fandtes vild Gjær, dertil tog man intet Hensyn, man stod jo ogsaa i Virkeligheden værgeløs overfor Tilfældet og formaaede slet ikke at anstille nogen Prøve. Forskningen skred saaledes frem ad denne ikke meget videnskabelige Bane, hvor der bestandig blev experimenteret med ubekjendte Størrelser, som dog ved Regnestykkets Opgjørelse bleve indførte som værende bekjendte. Man trøstede sig med, at i fysiologisk Henseende maatte forhaabentlig disse kjedelige Arter, som muligvis dog vare tilstede, forholde sig ens, men gjorde heri Regning uden Vært. I mine sidste Arbejder paaviste jeg f. Ex., at der er nogle Gjærsvampe og gjærsvampelignende Celler, som i Modsætning til den større øvrige Rest kun have Alkoholgjærvirksomheden uden at være i Besiddelse af Evne til et udsondre In-

vertin[1]). Og i mine følgende Afhandlinger vil der blive givet Exempler paa, at der ogsaa indenfor den Gruppe Saccharomyces-Arter, som have begge Fermentvirksomhederne, findes fremtrædende fysiologiske Differenser.

Anbringes der i samme Næringsvædske to Gjærsvampe, en med svag og en anden med kraftig Alkoholgjæringsevne, saa vil den svage vel som Regel bukke under i den stedfindende Konkurrence, men dog paa sin Side hæmme den stærkere Rival noget[2]). Have nu de to kæmpende Gjærarter samme Udseende, hvilket almindelig finder Sted, bliver Følgen, som Sagerne staa i Øjeblikket, at den experimenterende Fysiolog bliver skuffet, idet han tilskriver en af Arterne de Resultater, som kun komme frem derved, at to indbyrdes forskjellige konkurrerede om samme Næringsbund. Saadanne Vildfarelser have hyppig fundet Sted, og hvis de begaaede Fejl ikke, naar Eftersynet en Gang foretages, vise sig at være meget store, da skyldes dette et Held og ikke den anvendte Methode.

Der er skrevet og talt meget om Bryggerigjærens Udarten; de udenlandske Tidsskrifter indeholde jævnlig Afhandlinger derom, skrevne af de mest ansete Gjæringsteknikere. Denne Udarten tilskrives Maltets, Vandets og andre Faktorers Indflydelse. Men se vi nøjere paa disse Betragtninger, saa finde vi, at det Hele er en dunkel, svævende Tale uden sikker Begrundelse og aldeles blottet for paalidelige experimentelle Undersøgelser. Hvori bestaar da denne Udarten? Hvoraf vide vi, at Sacch. cerevisiæ overhovedet kan udarte? Svaret er i Virkeligheden hurtig givet: Vi vide i Øjeblikket endnu ikke, hvad Sacch. cerevisiæ er!

Først naar det er afgjort, om der findes forskjellige Arter og Racer eller ej, og Karaktererne for disse ere udfundne, erholde de for Theori og Praxis lige vigtige fysiologiske Undersøgelser sikre Udgangspunkter. Først da kan der med Udsigt til at naa en tilfredsstillende Løsning af Spørgsmaalene, der idelig trænge sig frem for os, tages fat paa Studiet af de enkelte Arters Virksomheder, af Lovene for de meget komplicerede Forhold, der op-

---

[1]) Emil Chr. Hansen, Om Saccharomyces apiculatus og dens Kredsløb i den frie Natur. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet. I B. 1881. p. 315) og: Undersøgelser over de Organismer, som til forskjellige Tider af Aaret findes i Luften i og omkring Carlsberg, og som kunne udvikle sig i Ølurt. (Samme Tidsskrift I B. 1882. p. 412).

[2]) Se min citerede Afhandling Om Sacch. apiculatus p. 323.

staa, naar de befinde sig i indbyrdes Konkurrence eller i Konkurrence med helt andre Organismer, f. Ex. med Bakterier, af Forholdene mellem Over- og Undergjær, af Betingelserne for Varieteternes Fremkomst, af disses fysiologiske Virksomheder og hele Forhold til Stamformerne.

Da jeg i 1878 udarbejdede mit ovenfor berørte Skrift, »Organismer i Ol og Olurt«, var jeg mig de foran fremdragne Spørgsmaal og Krav bevidst, og indsaa, at det ikke var muligt at komme videre ad den af mine Forgængere betraadte Vej; jeg indskrænkede mig derfor hovedsagelig til i min Omtale af Slægten Saccharomyces at henvise til de foreliggende Arbejder, idet jeg gjorde opmærksom paa, hvor usikker vor Viden var, og udtalte, at Undersøgelserne, naar de virkelig skulde bringes ud over, hvad navnlig Reess og Pasteur havde givet, maatte tages fra helt andre Synspunkter end forhen. Den for Experimentet lettest tilgængelige Art, Sacch. apiculatus, underkastede jeg, som foran berørt, først en Undersøgelse i forskjellige Retninger, og Sagen gik her forholdsvis let, men meget store Vanskeligheder beredte derimod de øvrige Arter mig. Uagtet jeg i Løbet af de henrundne Aar uafbrudt spejdede efter Nøglen til Problemets Løsning, lykkedes det mig dog først i Slutningen af Aaret 1881 at opdage denne, og da de nødvendige Prøver vare blevne gjennemførte, offentliggjorde jeg en kort Meddelelse derom det følgende Aar i Laboratoriets Tidsskrift I B. p. 400.

Herved føres nu denne Forskning ind paa nye Baner, ad hvilke forhaabentlig en Reform vil blive opnaaet.

I en Række Afhandlinger agter jeg efterhaanden at behandle de enkelte Led hver for sig i den store Kjæde af Undersøgelser, der kræves. Nærværende Bidrag skal hovedsagelig handle om den Indflydelse, som forskjellige Varmegrader udøve paa Dannelsen af Askosporerne.

Methoder.

Den, der vil foretage experimentelle Undersøgelser over Alkoholgjærsvampene, bliver naturlig ført ind paa et nøje Studium af Pasteur's »Études sur la bière«; denne Bog er nemlig Hovedværket.

Det fjerde Kapitel deri handler om det vigtige Spørgsmaal, Renkulturer, og iblandt de Former, hvormed der experimenteres, findes ogsaa en af de Organismer, som Reess henfører til Slægten Saccharomyces, nemlig Sacch. Mycoderma (Mycoderma vini) p. 109.

Fra Vin, hvor den havde dannet en Hinde, blev den overført i Ølurt og herfra i en Blanding af Gjærvand og Sukker og endelig atter i Ølurt. Til Forsøgene benyttede Pasteur som sædvanlig sine bekjendte Kolber med et ret, kort og et bøjet, langt Rør (se hans Fig. 22), og Udsædene bleve foretagne ved Hjælp af en i Forvejen flammerenset Platintraad. Med denne toges hver Gang af vedkommende Hinde kun en Ubetydelighed, som derpaa hurtigt blev overført i den nye Kolbe. Bestandig blev der sørget for, at de paagjældende Kolber kun et Øjeblik vare aabnede. »Paa denne Maade,« siger Pasteur, »fjerner man efterhaanden alle fremmede Kim, og da navnlig Mycoderma aceti, den sædvanlige Ledsager af Mycoderma vini. Myc. aceti formerer sig nemlig meget vanskelig i neutrale, sukkerholdige Vædsker. I Løbet af nogle faa Dage har der udviklet sig en Hinde, som ser ud til at være aldeles ren, og den mikroskopiske Undersøgelse viser, at den virkelig er fri for Myc. aceti, Mælkesyrebakterier etc.« Dette er Pasteur's Renkulturer.

Der er her to Sider at lægge Mærke til, nemlig hvorledes han tilvejebringer Renkulturen, og dernæst hvorledes han under Experimenterne bevarer den ubesmittet af Infektion udenfra. Hvad den førstnævnte Side angaar, saa have vi ovenfor set, at han søger at naa sit Maal derved, at han i en Række Kulturer bestandig begunstiger den Organisme, som han ønsker at beholde ene tilbage, og samtidig dermed søger at hæmme Udviklingen af den eller dem, som han vil fjerne. I det beskrevne Forsøg viste den mikroskopiske Undersøgelse, at der paa et vist Stadium hverken fandtes Bakterier eller Skimmelsvampe, og at Hinden kun bestod af gjærsvampelignende Celler. Hermed lader Pasteur sig saa nøje, og tager det for givet, at disse gjærsvampelignende Celler alle tilhøre een Art. Derfor har han imidlertid ingen Sikkerhed. Der gives nemlig flere Arter med saadanne Celler, der under de omtalte Ernæringsforhold kunne danne Hinder, og som ved den mikroskopiske Undersøgelse ikke kunne skjelnes fra hverandre; ja, der kan i Hinden endog være kommen Celler af Gjærsvampe, hvis Natur det ellers er at leve som Bundgjær, og da disse ofte have samme Form og overhovedet samme Udseende som de egentlig hindedannende Arters, vil det følgelig ikke være muligt at opdage dem ved en blot og bar mikroskopisk Prøve. Ved sin Dyrkningsmaade har Pasteur kun kunnet fjerne de Organismer, der under de af ham fremstillede Ernæringsforhold ikke formaaede at udholde Konkurrencen med den begunstigede, men sammen med den kan der leve en hel Skare (nemlig alle dem, der have nogen-

lunde samme Ernæringsvilkaar som førstnævnte), uden at de i nogen synderlig Grad behøve at genere hverandre. Det er, kort sagt, umuligt at indrette Dyrkningen saaledes, at kun een eneste af de talrige existerende Arter derved begunstiges. Denne Fremgangsmaade vil altsaa kun med nogen Sikkerhed kunne anvendes i saadanne sjældne Tilfælde, hvor man har Arter med saa tydelige Karakterer, at de ikke let forvexles med andre, og hvor en Kontrol er mulig.

Lader os imidlertid antage, at Pasteur har været heldig og virkelig har opnaaet en Renkultur; vi komme da til Sagens anden Side: hvorledes bevares den? Hertil yde hans foran omtalte Kolber en udmærket Hjælp. Med Hensyn til deres Anvendelse henvises til de udførlige Beskrivelser, der findes i hans nævnte Bog, p. 29 o. flg. Disse Kolber kunne navnlig anbefales i saadanne Tilfælde, hvor man i længere Tid maa dyrke en eller anden Mikroorganisme i en Næringsvædske og hyppig er nødsaget til at forny denne, ligeledes naar man for at kunne udføre en kemisk Analyse eller af andre Grunde maa anvende store Vædskemængder til Dyrkningen, og fremfor alt, naar man skal arbejde med Gjæringsorganismer, som fremkalde stærk Luftudvikling og Skumdannelse. Paa Carlsberg Laboratoriet blive de anvendte i Størrelser fra $^1/_8$ til $1^1/_4$ Liter hver. De kunne naturligvis efter de forskjellige Formaal gives Tillæmpninger.

Naar Pasteur taler om ren Gjær, ogsaa naar han benytter det stærke Udtryk »absolument pure«, maa dette i Følge det Foregaaende ikke forstaas, som om der er Tale om en eneste Gjærart, men kun saaledes, at den saakaldte rene Gjær er fri for Bakterier og Skimmelsvampe. Selv siger han Intet tydeligt om sin Fremgangsmaades Grændse; det ses derfor ikke, om han har erkjendt denne; men stærkt træder det Mangelfulde i hans Methode frem i de Partier af Bogen, der handle om hans »Dematium — levûre« (Sacch. Pastorianus), »levûre caséeuse« og »levûres aérobies«.

Paa nogle Steder (f. Ex. p. 164 og 165) siger han ligefrem, at Sacch. Pastorianus er en Udviklingsform af en Skimmelsvamp (Dematium), der almindelig findes paa Druerne; paa andre Steder (p. 170, 171 og 177) udtaler han sig derimod i svævende Udtryk, og det ses tydeligt, at han ikke har kunnet komme til nogen bestemt Afgjørelse. Denne Uklarhed træder ogsaa frem paa andre Punkter i hans Meddelelser om Sacch. Pastorianus, f. Ex. p. 166, hvor han ikke har kunnet afgjøre, om de af ham iagttagne runde og langstrakte Celler virkelig høre genetisk sammen i een Udviklingsrække.

Et svagt Punkt i den Henseende er ligeledes hans Undersøgelser over »levûre caséeuse«, p. 196. Pasteur siger at have erholdt denne mærkelige Gjær paa følgende Maade: I en af hans Kolber blev Ølurt, hvortil der var sat Alkohol og en Vinstensopløsning, opvarmet i et Vandbad, indtil denne Blanding havde erholdt en Temperatur af 50° C. Derpaa blev Kolben inficeret med Overgjær, som den forefindes i Brændevinsbrænderierne og Bryggerierne, og, da det var sket, udsat for den nævnte Temperatur i Vandbadet i en Time. Han betegner dette som en Methode til at rense Gjær; hvorledes han er kommen ind derpaa, ses ikke. Vi skulle nu betragte det Resultat, som han opnaaede derved. Efterat Kolben med den paa den foran beskrevne Maade pinte Gjær havde staaet i nogle Dage, begyndte nogle af Cellerne at formere sig, og der indtraadte Gjæring. Der udviklede sig en meget mærkværdig Gjærform, som han paa Grund af det osteagtige Bundfald, som den siges at danne, kalder »levûre caséeuse«.

Det, vi nu navnlig kunde ønske at vide, er, om denne nye Gjær er kommen frem derved, at de udsaaede Overgjærceller ere blevne omdannede, eller om disse tvertimod ere blevne dræbte ved den strænge Behandling, og om det er en helt anden Gjærart, der har overlevet denne, og da en Gjærart, som ved Forsøgets Begyndelse fandtes indblandet i den Overgjær, som blev benyttet. Pasteur's Undersøgelser standse dog atter her, hvor det skarpe Sporgsmaal stilles, og Vanskelighederne begynde. Mest tilbøjelig synes han at være til at antage, at det er en i Overgjæren oprindelig indblandet fremmed Gjærart, der nu har trængt sig frem. De, som ønske nærmere Oplysninger herom, ville finde disse i en af mine følgende Afhandlinger.

Det Afsnit af hans Bog, der handler om »levûres aérobies«, p. 201 o. flg., lider af lignende Mangler som de netop foran berørte, og det vilde derfor kun blive en trættende Gjentagelse her nærmere at gaa ind derpaa.

P. 71 og p. 149 meddeler Pasteur, hvorledes man skal kunne udskille Sacch. apiculatus fra andre Gjærarter, naar den, som det hyppig sker, er sammenblandet med saadanne i Vindruemosten. I dette Øjemed anbefales at filtrere denne saaledes, at kun den klare Vædske løber igjennem Filteret. I denne filtrerede Most antager Pasteur, at man bestandig vil finde en Vegetation af Sacch. apiculatus, der er fri for de tidligere tilstedeværende andre Gjærarter. Hertil er at bemærke, at Sacch. apiculatus vel hører til de mindste Gjærsvampe, vi kjende, men at ogsaa andre Arter af samme Slægt, f. Ex. den meget omtalte Sacch. Pastorianus, kunne

danne Celler af en ligesaa ringe Størrelse. Mærkelig nok synes Pasteur rent at have glemt dette, skjøndt han dog selv p. 183 siger, at den sidstnævnte Art under visse Forhold kan danne Celler, som ere meget mindre end de normale, og antyder, at disse smaa Celler muligvis ere Reess's Sacch. exiguus. Hvorledes det forholder sig med denne Gisning, skulle vi ikke i Øjeblikket undersøge, men blot erindre om, at de omtalte smaa Gjærceller, der ikke høre til Sacch. apiculatus, altsaa ligesaa godt som dennes Celler kunne slippe igjennem Filteret. I de Tilfælde, hvor dette sker, faar man følgelig en Sammenblanding af flere Arter, og da Sacch. apiculatus har en meget svag Gjæringsevne, vil den over for de i Reglen meget stærkere Rivaler, med hvilke den kommer til at konkurrere, ikke under en længere Gjæring kunne hævde sig. Af den Grund kan Pasteur's Fremgangsmaade ikke anbefales; jeg valgte derfor ogsaa en anden i mine Experimenter med den nævnte Art[1]).

Vejen, ad hvilken en Renkultur under alle Omstændigheder vil kunne opnaas, lige meget hvilke fysiologiske og morfologiske Egenskaber vedkommende Mikroorganisme er i Besiddelse af, frembyder sig i Virkeligheden af sig selv, nemlig Udsæd af een eneste Celle i en i Forvejen steriliseret Næringsvædske paa en saadan Maade, at fremmede Organismer ikke under Dyrkningen kunne snige sig ind. Det vil være meget vanskeligt at udfinde, hvem der først har udtalt denne i sig selv saa simple og dog saa frugtbare Tanke. Flere Forskere have i de sidste Aar hver paa sin Maade stræbt at løse Problemet.

I Pasteur's Bog findes der p. 193 Tilløb i denne Retning. Han anbefaler at udtørre en Portion af den Gjær, hvormed man ønsker at operere, og derpaa omdanne den til et fint Støv. Dette Gjærstøv udkastes nu fra en passende Højde saaledes, at man ved nedenunder at aabne nogle Vakuumskolber med steriliseret Næringsvædske (disse beskrives i nærværende Tidsskrifts I Bind, 4 Hefte, p. 391) har Udsigt til at opfange en Del deraf. Hvis Tilfældet er En gunstig, kan det hænde, at en eller anden af Kolberne kan komme til at opfange een levende Gjærcelle, og denne vil følgelig i Næringsvædsken kunne grundlægge en virkelig Renkultur. Det, der bragte Pasteur ind paa denne Tankegang, var den Forestilling, at hver enkelt Celle i en Gjærmasse, tilhørende een og samme Art, og altsaa ligeledes hver enkelt Celle i en Koloni, udviklet af een Modercelle, maa have sine individuelle Ejendommeligheder, og

[1]) l. c. p. 313.

at man ved at dyrke hver Celle for sig ogsaa vilde kunne opnaa ligesaa mange forskjellige Slags Gjær, som der anstilles Kulturer, hver med een Celle som Udgangspunkt. Efter denne Tanke skal følgelig endog en lille Portion Gjær indeholde et uhyre Antal Varieteter og Muligheder til et endnu større. Karakterer, ved hvilke der kunde skjelnes imellem de Gjærvegetationer, der optraadte i Kolberne, havde Pasteur dog ikke.

Som man maatte vente, opnaaede han intet bestemt Resultat af sit Forsøg, og af hans Udtalelser synes det at fremgaa, at han kun har anstillet en flygtig Prøve dermed. Det er heller ikke blevet gjentaget hverken af ham selv eller af Andre.

Idet vi her have forsøgt at erholde et Overblik over de Methoder, Pasteur har anvendt for at fremstille Renkulturer af Saccharomyces-Arterne, maa vi erindre, at det er syv Aar siden, han udgav sit berømte Værk; hvis han nu skulde have skrevet det, vilde det sikkert paa flere Punkter være blevet anderledes.

Af det Foregaaende ses, at min Opgave maatte blive den: først at uddanne Methoden saaledes, at jeg kunde erholde Vegetationer, der hver for sig stammede fra een eneste Celle, og dernæst at udfinde, om disse Renkulturer frembyde konstante Karakterer, og i saa Fald, hvilke disse Karakterer ere.

I en af de omtalte Pasteurske tohalsede Kolber, hvori Vand ved Kogning var blevet steriliseret og derpaa atter afkjølet, anbragde jeg lidt af den Gjær, hvoraf jeg ønskede at erholde en Renkultur. Ved forberedende Kulturer havde jeg bestandig sørget for, at den ikke blot kom til at bestaa af unge, kraftige Celler, men ogsaa, saa vidt det var muligt, at Cellerne af den ønskede Art vare i Overvægt. Under temlig stærke Rystninger bleve Cellerne jævnt fordelte i Vandet. Prøver toges derpaa ud, for at jeg ved Tælning med Hæmatimetret kunde bestemme, hvormange Celler der fandtes i 1 Kub.-Cent. af Vandblandingen. Heraf blev der ved Beregning bestemt, i hvilken Grad Fortyndingen maatte fortsættes, for at man i 1 Kub.-Cent. af den endelige Vandblanding tilsidst kunde have f. Ex. 0,5 Celler. Af en Række Udsæd, hver paa 1 Kub.-Cent., skulde altsaa kun hver anden bringe en Gjærcelle med sig. For at kunne udføre denne Fortynding med tilstrækkelig Nøjagtighed og uden i højere Grad at være udsat for en udenfra kommende Infektion, var Guttaperkaslangen paa Kolbens

rette Hals delt i to Stykker, og imellem disse var der indskudt et passende Maalerør af Glas, hvilket for begge Ender kunde lukkes ved Hjælp af Klemhaner. Denne Kolbe blev paa sædvanlig Vis hurtig sat i Forbindelse med en anden, hvori der var steriliseret Vand, og efterat dette havde modtaget sine i Forvejen beregnede Maal af Infektionsvandet, beholdt sidstnævnte Kolbe, Nr. 2, Maaleapparatet, og sattes hermed i Forbindelse med en tredie Kolbe; efterat denne var bleven inficeret, blev paa lignende Vis en fjerde inficeret fra den, Alt efter den forudgaaede Beregning. Naar endelig den sidste Kolbe var færdig, og der til dens Guttaperkaslange var knyttet et Maalerør paa 1 Kub.-Cent., blev det nævnte Maal af det færdige Infektionsvand ført over i hver af et større Antal Kolber med Urt. Under det beskrevne Arbejde blev der sørget for, at Cellerne ved Rystning saa vidt muligt bleve jævnt fordelte, og Maalene toges bestandig i smaa Portioner, afbrudte ved gjentagne Rystninger af Vædsken; endvidere bleve altid de paagjældende Kolber saa hurtigt som muligt satte i Forbindelse med hinanden og atter hurtigt lukkede, efterat de et Øjeblik vare blevne aabnede. Forsøgene, som udførtes paa denne Maade, gave gode Resultater. Mangler klæbe dog derved; navnlig har man ingen Sikkerhed for, at der i Kolben med den færdige Infektionsvædske virkelig findes det Antal Celler, man forud har beregnet; det kan endog indtræffe, at der ikke er kommen en eneste Celle deri, ligesom ogsaa, at der kommer flere, end der var bestemt. Aarsagen hertil maa søges deri, at det er meget vanskeligt at opnaa en jævn Fordeling af Cellerne i de stærke Fortyndinger, hvormed man tilsidst kommer til at arbejde. Vanskeligheden træder især stærkt frem, naar Cellernes Antal er meget ringe i Forhold til den Vandmængde, hvori de findes, og naar der kun overføres smaa Maal fra Kolbe til Kolbe.

For at undgaa Fortyndingerne, der tilmed tage megen Tid, kan man anvende en anden Fremgangsmaade. Paa Midten af et Dækglas (Fig. 1) indridses et Kvadrat, hvis Side f. Ex. er 4 Millim., og dette inddeles atter i talrige smaa Kvadrater af en saadan Størrelse, at man kan overskue et af dem ved Hjælp af det Objektiv, man maa benytte for med Bestemthed at kunne skjelne en lille Gjærcelle. Størrelsen af det store Kvadrat er bestemt af det Formaal, at en meget lille Vanddraabe, hvori der er Gjærceller, skal kunne anbringes indenfor dets Omrids, og da Hensigten er at tælle disse, gjør man Kvadratet saa lille, som det paa nogen Maade gaar an; jo mindre

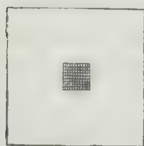


Fig. 1.

det er, desto hurtigere udføres nemlig Tælningen. Det Vigtigste for Prøven er imidlertid, at man nøje sørger for, at vedkommende Draabe ikke paa noget Sted kommer udenfor det store Kvadrats Grændser; dette vilde nemlig være det Samme som at anbringe Draaben paa et almindeligt altsaa ikke kvadreret Dækglas, og Kontrollen vilde følgelig høre op. Naar Draaben er anbragt, maa den ikke være for stærkt hvælvet, hvis man med Sikkerhed skal kunne se Alt, hvad den indeholder. De smaa Kvadrater ere indridsede for at give Holdepunkter for Tælningen. Forskjellen imellem dette og Hayem's Tælleapparat bestaar deri, at med sidstnævnte kan man kun udskjære Partier af vedkommende Draabe, men ikke bestemme ved direkte Tælning, hvad hele Draaben indeholder; dette er derimod muligt ved Hjælp af mit kvadrerede Dækglas. For at Vandet ikke skal fordampe, og Cellerne indtørre, maa det omtalte Dækglas med sin Draabe forbindes med et fugtigt Kammer. At lægge det efter sædvanlig Vis paa et Objektglas gaar ikke an; thi Draaben vil da flyde udenfor Grændserne. Til Mikroskoper af sædvanlig Konstruktion benyttes Böttcher's Kammer, hvoraf hosstaaende Fig. 2 giver et lodret Gjennemsnit; *a* er det kvadrerede Dækglas med sin hængende Draabe, *b*; *c* er Kammeret; *d* er et Vandlag, der er anbragt paa Bunden for at hindre Fordampningen. Anvendes et af Nachet's saakaldte »Microscopes renversés« kan det af mig dertil konstruerede Kammer benyttes; i saa Fald faar Draaben et roligere Leje, idet den nemlig bliver opadvendt[1]). I en Kolbe med steriliseret Vand anbringes lidt af den Gjær, hvormed Forsøget skal udføres, og efterat Cellerne ved Rystning ere blevne jævnt fordelte, tages med en tynd Glasstang eller med en dertil passende Platintraad en lille Draabe, som anbringes i det store Kvadrat paa det omtalte Dækglas. Dette fæstnes til det fugtige Kammer, og Tælningen finder nu Sted. Er Draaben for rig paa Celler, saa at en Tælning er umulig, maa der naturligvis laves et nyt Præparat af en stærkere fortyndet Blanding. Ved lidt Erfaring vil man dog næsten altid være sikker paa strax at gribe det Rette. Det er det

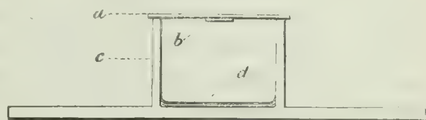


Fig. 2.

[1]) Emil Chr. Hansen, Et fugtigt Kammer til Dyrkning af Mikroorganismer. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet I B. 3 Hefte. 188 , p. 328).

Sikreste, at udføre to Tælninger, og hvis disse stemme overens, føres en lignende Draabe, som den, der blev brugt til Tælningen, over i en Kolbe, der indeholder en i Forvejen afvejet bestemt Mængde steriliseret Vand. Infektionsvædsken er paa denne Maade færdig, og man ved nu, at den idetmindste meget nær indeholder det Antal Celler, som Beregningen angiver. Det nøjagtige Tal vilde man faa, ifald selve Dækglasset med den derpaa værende Draabe blev ført over i Vandet. I saa Fald maatte man i Stedet for Pasteurske Kolber benytte en Flaske med tilstrækkelig vid Hals, for at Dækglasset kan slippe ned i Vandet. Ved Hjælp af Kautschukpropper med Gjennemboringer og deri indsatte Glasrør kunde man da indrette Flasken efter samme Princip som den tohalsede Kolbe. Har man sin Infektionsvædske i fuldstændig Orden, saa at der virkelig er det beregnede Antal Celler tilstede i det bestemte Rumfang Vand, f. Ex. som ovenfor angivet, 0,5 Celler i hver Kub.-Cent., og man derpaa ved Hjælp af Maalerøret udsaar 1 Kub.-Cent. i hver af et større Antal Kolber med passende Næringsvædske, saa vil man dog alligevel vistnok aldrig naa Idealet at faa en Infektion i hver anden Kolbe, hverken mer eller mindre. Dette beror væsentlig derpaa, at man ikke kan faa Infektionsvædskens Celler saa fuldstændig jævnt fordelte, som dette vilde kræve. Ogsaa kan det naturligvis hændes, at nogle af Cellerne ikke have tilstrækkelig Livskraft til at grundlægge nye Vegetationer. Ved Tælningen vil man ligeledes undertiden være i Tvivl, om en Celle er levende eller ej, og om man skal tælle hver enkelt Celle i en Koloni, eller om man skal regne den hele Koloni for een Celle; det Sidste vil naturligvis være det Rigtigste, hvis alle Cellerne vedblive at være forbundne, indtil de ere blevne overførte i en af Kolberne med Næringsvædsken, men skilles de ad forinden, hvorved de altsaa blive istand til hver for sig at grundlægge en Vegetation, saa har man begaaet en Fejl derved. Erfaringen viser, som sagt, at vi, hvormeget vi end anstrænge os, ikke kunne faa disse Forsøg til at gaa saa mathematisk nøjagtigt, som vi kunde ønske, men dog har jeg, som ovenfor anført, opnaaet gode Resultater derigjennem. Dette beroede væsentlig derpaa, at jeg i mine inficerede Kolber tidlig fik Øje for et Skjelnemærke, hvorved jeg kunde adskille dem, der hver kun havde modtaget een Gjærcelle eller een sammenhængende Koloni (hvilket her vil sige det Samme) fra dem, der hver havde modtaget flere. Paa Grund af Iagttagelsens Betydning for Analysen paa dette Omraade, meddelte jeg allerede for halvandet Aar siden en Oplysning derom i nærværende Tidsskrift.

Fra det Øjeblik, da der træder en makroskopisk kjendelig Udvikling frem i de inficerede Kolber, iagttager man temmelig let, at der i nogle findes flere, i andre derimod kun een Gjærplet i hver. De træde paa dette Stadium tydeligt frem i den endnu klare Næringsvædske (i de tænkte Tilfælde Olurt). Ved gjennemfaldende Lys vise de sig som mørke, ved paafaldende Lys derimod som hvide Pletter, aldrig frit svævende i Vædsken, men bestandig knyttede til Væggen. Naar Kolberne staa ved almindelig Stuevarme uden at blive rystede, kan man i Løbet af flere Dage iagttage disse Pletter og kontrolere, om deres Antal forøges eller ej. Det er ganske hensigtsmæssigt at have saadanne Kolber staaende i Termostaten (f. Ex. ved 16—18° C.); thi man er da sikker paa at undgaa den Bevægelse i Vædsken, som stærke Temperatursvingninger kunne fremkalde. Pletterne blive efterhaanden større og større, Vædsken mættes lidt efter lidt med Kulsyre, smaa Oer af Skum begynde at komme frem paa Overfladen, Gjæringen tager rigtig fat, og ved den Uro og Uklarhed, som herved efterhaanden opstaar i Vædsken, standses vor makroskopiske Undersøgelse. Vi tage nu de Kolber ud, som hele Tiden under Iagttagelserne hver have fremvist kun een Gjærplet; det er nemlig vore Renkulturer, hver stammende fra een eneste Celle eller, hvad der i det givne Tilfælde betyder det Samme, fra een Koloni af indbyrdes forbundne Celler. Beviset for Slutningens Rigtighed er et indirekte. Antage vi nemlig, at der i en af vore Kolber med Urt indføres to eller flere livskraftige og indbyrdes adskilte Gjærceller, saa ville disse, idet Kolberne, som Forsøget kræver det, stærkt rystes, for at den indførte Infektionsvædske kan blive godt blandet med Næringsvædsken, ogsaa her som Regel blive skilte ad, og forsaavidt de komme til at formere sig, hver danne sit særskilte Vegetationscentrum. Naar Vædsken er kommen til Ro, bundfældes de nemlig, og det kan næppe tænkes, at de skulde komme til at lejre sig paa det selvsamme Punkt. Har Vegetationen i en Kolbe med een Gjærplet fæstnet sig paa Kolbens skraaenende Væg og ikke dybest nede, da er dette et nyt Tegn paa, at der oprindelig kun blev udsaaet een Celle, og Kolber af den Art høre netop til de ret hyppige Tilfælde. Medens Reglen altsaa bliver denne, at eet Vegetationscentrum i en Kolbe betyder en Udsæd af een levende Celle, saa kan man ikke omvendt sige, at flere Vegetationscentra i Almindelighed skyldes Udsæd af flere Celler. Ogsaa en Kolbe, som kun har modtaget een Celle, vil ikke sjelden hurtig erholde flere Centra. Opstaar der nemlig endog blot en temmelig ringe Bevægelse i

Vædsken, efterat vedkommende Celle ved Knopskydning har dannet en Koloni, ville de nydannede Celler saaledes let kunne skilles ad og paa den Maade grundlægge hver sit Vegetationscentrum. Heraf følger, at der som Regel har været flere Renkulturer tilstede i vore Forsøg, end vi bemærkede.

Lader os endvidere tænke os det Tilfælde, at der i en Kolbe er bleven udsaat een livskraftig Celle, som i normal Tid grundlagde en Koloni, og desuden en eller flere svage Celler, der først sent kom til at formere sig, længe efter at Gjæringen havde standset vore makroskopiske Iagttagelser. Hvis Saadant kan indtræffe, vil der altsaa her være en Fejlkilde. Det er imidlertid, vel overvejet, ikke rimeligt, at det vil kunne ske; thi have de svage Celler ikke kunnet komme til Kræfter i Forsøgets Begyndelse, medens der endnu var forholdsvis gunstige Livsforhold tilstede, kan det næppe antages, at de senere skulde blive istand dertil, naar den stærke Konkurrent har bredet sig og optaget en stor Del af Ilten og Næringsstofferne i Vædsken og til Gjengjæld fyldt den med sine Gjæringsprodukter. For at sikre os imod en mulig Skuffelse ville vi dog antage, at der iblandt vore Kolber, som hver have 1 Gjærplet, undtagelsesvis kan forekomme en og anden, som ikke er bleven inficeret med een, men med flere Celler. Spørgsmaalet bliver da, hvad vi her skulle gjøre for dog en Gang at komme til Ro i denne vanskelige Sag og naa det faste Udgangspunkt, der var Maalet for vore Bestræbelser. Svaret er: Der maa for hvert Forsøg fordres et større Antal af Kolber, hver med een Gjærplet, og forsaavidt vi skulle erkjende disse for Renkulturer af een og samme Art, maa de alle ved de Prøver, vi foretage med dem, stemme nøjagtig overens; og gjentages det ovenfor beskrevne Forsøg, maa vi atter anden Gang erholde Renkulturer af selv samme Art som første Gang. Som det ses, bevæge Experimenterne sig her i en Ring: Renkulturerne skulle sætte os istand til at undersøge, om der findes konstante Arts-Karakterer eller ej, og, hvis disse foreligge, da gjøre det muligt for os at udfinde, hvori de bestaa; og Karaktererne benyttes saa omvendt atter til at prøve, om det, der kaldes en Renkultur, virkelig er det. Som berørt i det Foregaaende, har jeg været saa heldig at opdage saadanne Karakterer; hvilke disse ere udvikles nærmere dels i det følgende Afsnit dels senere i andre Afhandlinger.

Naar der i mine Undersøgelser over Slægten Saccharomyces benyttes Udtrykket »Art«, saa forstaas derved en Vegetation, som jeg i Aar og Dag paa forskjellig Maade har dyrket, og som, saa-

længe jeg har kunnet iagttage den, bestandig har bevaret visse, bestemte Kjendetegn, hvorved den tydeligt kunde skjelnes fra andre nærstaaende. Spørgsmaalet om, hvad der maa opfattes som Species, Varietet, Race eller Afændring, kan jeg dog ikke i nærværende Afhandling indlade mig paa; det vil først blive behandlet senere, naar jeg har naaet en Afslutning paa Undersøgelserne.

Kort efter, at jeg havde begyndt at anvende den ovenfor beskrevne Methode, blev den underkastet en let tilgængelig Prøve. Hertil benyttede jeg den ved sin udprægede Form og sin fysiologiske Ejendommelighed karakteristiske Sacch. apiculatus. Celler af denne Art bleve i Infektionsvandet blandede med Celler af almindelig Bryggerigjær, hvorpaa en Række Kolber med steriliseret Urt paa den ovenfor beskrevne Maade bleve inficerede. Resultatet blev da, at nogle af de Kolber, i hver af hvilke der havde udviklet sig een Gjærplet, indeholdt kun ovale Celler lig Bryggerigjærens og de øvrige kun citronformede, tilhørende Sacch. apiculatus. Dette var allerede et smukt Bevis for Methodens Brugbarhed.

Forinden Forsøgene anstilledes, blev vedkommende Værelse gjort godt rent, og der blev saa vidt muligt sørget for, at der paa selve Arbejdsdagen fandtes en rolig, støvfri Luft derinde, og kort sagt gjort alt muligt for at undgaa Infektion udenfra. Hvis en saadan i højere Grad var indtraadt, vilde jo et større Antal af de benyttede Kolber være blevne ødelagte og Arbejdet i væsentlig Grad forstyrret. Saadanne Forberedelser tage unægtelig en Del Tid, men jeg er kommen til den Erfaring, at de i Længden betale sig; thi Experimenterne faa herved en Sikkerhed, som de ellers ofte vilde mangle. I henved 300 Kolber med Urt, som til forskjellig Tid i Løbet af et Par Maaneder bleve anvendte, iagttoges uagtet nøje Eftersyn fremmede Organismer kun i 2; disse vare nemlig blevne angrebne af Penicillium glaucum. Dette viser, at Øjemedet næsten fuldstændig blev opnaaet.

I Robert Koch's Afhandling om Methoder til Undersøgelse af Mikroorganismer[1]) fremhæves stærkt den Betydning, som et fast Næringssubstrat har for Dyrkningen af disse. Han anvendte hertil dels Kartoffelskiver og dels en Blanding af Gelatine med en eller

---

[1]) Robert Koch, Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. (Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte. I B. 1881. p. 18).

anden Næringsvædske, bestandig steriliseret ved Opvarmning. Naar Kartoffelskiverne eller den stivnede Næringsgelatine en Tidlang udsættes for Luftens direkte Paavirkning, vil der paa disse Substrater regelmæssig blive afleiret en større eller mindre Mængde forskjellige Kim. Bringes nu det Hele ind i et fugtigt Rum, saa vil man efter nogle faa Dages Forløb saavel paa Kartoffelskivernes som paa Gelatinens Overflade finde en Del smaa Vegetationspletter, hvis Farve og øvrige Udseende kan være meget forskjellig. Ved den mikroskopiske Undersøgelse faar man det Indtryk, at idetmindste de fleste af disse Vegetationscentra indeholde hver een Art. I mange Tilfælde er der rimeligvis ogsaa blevet aflejret enkelte Kim hver for sig hist og her paa den udsatte Næringsbund, og disse ville da danne hver sin Renkultur. Paa denne Maade vil man altsaa ogsaa have nogen Udsigt til at erholde Renkulturer af Saccharomyces-Arterne, naar man navnlig i Frugttiden udsætter de omtalte Kartoffelskiver eller passende Næringsgelatine for Luftens Paavirkning i Frugthaverne. Af Koch's Meddelelser lære vi ligeledes, at man ved at blande Vand, hvori der findes levende Mikroorganismer, sammen med Næringsgelatine, som endnu er flydende, da i denne, naar den er stivnet, vil erholde flere særskilte Vegetationscentra, hvoraf idetmindste nogle maa antages at stamme fra en eneste Kim. Hælder man den saaledes inficerede og endnu flydende Gelatine ud i mere eller mindre tynde Lag, kunne disse Vegetationer under deres Væxt gjennembryde Massen og komme op paa Overfladen, hvorved de da blive mere tilgængelige for Undersøgelsen. Det forudsættes bestandig, at Dyrkningsforsøgene foretages i et fugtigt Rum og ved en ikke for lav Temperatur. Infektion fra Luften frembyder her ikke den Fare, som naar man experimenterer med Vædsker; thi kommer der i Gelatine-Kulturen Kim udenfra, saa ville disse, hvis deres Antal ikke er overordentligt stort, kun undtagelsesvis falde sammen med de udsaaede Kim eller med de deraf udviklede Vegetationer; i Regelen ville de derimod grundlægge særskilte Vegetationer. Da Næringssubstratet er fast, kan der ejheller som i en Vædske finde en Sammenflyden og Sammenblanding Sted. Sikrest er det naturligvis alligevel at anvende saa megen Forsigtighed som mulig. Brefeld og andre Forskere have vel tidligere end Koch anvendt en lignende Fremgangsmaade som den ovenfor beskrevne, men det er Koch's Fortjeneste at have uddannet den videre og at have givet den en meget udstrakt Anvendelse.

Under et Besøg i Koch's Laboratorium i Efteraaret 1882 havde jeg Lejlighed til at se, at der ved Hjælp af den ovenfor

kortelig beskrevne Methode kunde erholdes gode Resultater med Hensyn til Studiet af Bakterier. Da jeg kom hjem, anstillede jeg derfor en Prøve med Saccharomyces-Arterne. For at faa at vide, om man paa den Maade virkelig kunde erholde Renkulturer af disse, sammenblandede jeg to Gjærarter, der med Sikkerhed ved en mikroskopisk Undersøgelse kunde skjelnes fra hinanden, nemlig Sacch. apiculatus og Sacch. cerevisiæ, og anbragde derpaa denne Blanding i vedkommende Gelatine. Næringsvædsken i denne bestod af Ølurt, og den blev holdt flydende i et Vandbad, hvis Temperatur var 30—35 ° C. Ved Rystning bleve Cellerne, saavidt muligt, jævnt fordelte i Næringsgelatinen; da dette var sket, blev denne hældt ud paa en i Forvejen flammerenset Glasplade, som derpaa anbragdes under en fugtig Glasklokke. Efter et Par Dages Forløb saas tydeligt nogle smaa graaladne Pletter; Dyrkningen blev imidlertid fortsat indtil den 8de Dag, paa hvilken en Skimmeltue havde udviklet sig i temmelig høj Grad. Da Pladen blev undersøgt, viste det sig, at Penicillium glaucum var den eneste fremmede Organisme, der havde sneget sig ind i Kulturen. Ved nøje at betragte de omtalte Pletter opdagede man, at nogle vare lidt slimede, lidt mørkere og i Reglen mindre end de øvrige; foruden ved de anførte Kjendetegn adskilte de sidste sig tillige derved fra de førstnævnte, at de havde et tørt Udseende. Forskjellen var dog ikke meget fremtrædende. Pladen indeholdt 70 Pletter, og heraf tilhørte omtrent Halvdelen hver Art. I de slimede Pletter fandtes kun Sacch. apiculatus; de tørre, med Undtagelse af en, indeholdt udelukkende Sacch. cerevisiæ; i den ene (altsaa c. $1^1/_2$ % af det hele Antal Pletter), hvori begge Gjærarter fandtes, dannede Sacch. cerevisiæ Vegetationens øverste Lag, medens Sacch. apiculatus optraadte som en underordnet Indblanding i de underste. Dette forklares naturligt derved, at den er den svageste af de to. Naar man ved Mikroskopets Hjælp vil danne sig en Mening om, hvorvidt en saadan Vegetationsplet er ren eller ej, bør man overhovedet aldrig lade sig nøje med at undersøge de øverste Lag, thi her vil man, hvis Flere have dannet Pletten, som Regel kun finde den stærkere Konkurrent, da alle de svage regelmæssig ville være tilstede i de underste Partier. Ved at gjentage min Prøve ved Hjælp af Sacch. apiculatus og en af de Arter, der kunne bestemmes som Sacch. Pastorianus, erholdt jeg i Hovedsagen samme Resultat som i det første Forsøg. Saavidt jeg ved, har hverken Koch eller nogen Anden underkastet Methoden en Kontrol som den ovenfor beskrevne, og det er dog egentlig først derigjennem, at man kan erholde Klarhed over Methodens Grændser og Sikker-

hed i at anvende den. Heraf læres altsaa, at Gjærcellerne i de allerfleste Tilfælde ere blevne adskilte og udsaaede hver for sig, og at de dannede Vegetationspletter næsten bestandig indeholde Renkulturer. Spørgsmaalet er nu, hvorledes man kan undgaa de urene Vegetationer, der som truende Undtagelser jo virkelig indfinde sig. Den mikroskopiske Undersøgelse kan kun hjælpe i de Tilfælde, hvor der er Tale om saadanne karakteristiske Former som dem, hvormed den beskrevne Prøve blev anstillet; men overfor den store Gruppe af Arter med ovale og pølsedannede Celler er der derimod Intet at udrette ad den Vej. Det gjælder om disse ligesom om de tidligere beskrevne Forsøg paa at fremstille Renkulturer, at Faren for Fejltagelser i samme Grad indskrænkes, som den ønskede Art er i Overvægt i den Gjærmængde, man anvender. Det Samme naas naturligvis ogsaa ved at gjentage Forsøget saaledes, at det første bliver Udgangspunkt for det andet, og dette for det tredie o. s. v. Den fuldt betryggende Sikkerhed faar man dog ikke ad den Vej; man opererer her bestandig med Heldet og har ingen Kontrol, hvorved man kan afgjøre, om man har naaet Maalet eller ej.

Betingelserne for ved Hjælp af Gelatinen at kunne opnaa Renkulturer ere, at Udsædens Celler blive tilstrækkelig adskilte fra hverandre, saa at de ved Knopskydningen udviklede Kolonier ikke kunne komme til at smelte sammen. Cellernes Antal maa derfor i Forhold til Næringsgelatinens Masse være temmelig ringe. Indeholder denne altsaa forholdsvis faa Celler, og ere disse ved Rystning virkelig blevne jævnt fordelte i den Hinde, der er gydt ud over Glaspladen, da ville ogsaa de dannede Vegetationspletter hver stamme fra een Celle. Den ene Plade med sin Hinde bringer imidlertid ikke megen Oplysning om, hvorvidt Maalet er naaet eller ej: det er nemlig kun Fordelingen af Pletterne, der her giver os et lille, og et kun utydeligt Vink. Tage vi derimod endnu en Plade og anbringe herpaa en Hinde af samme Blanding som den første og af samme Størrelse og Tykkelse, saa erholde vi en Kontrol, og i samme Grad, som vi have naaet at fyldestgjøre de stillede Betingelser, vil Kontrollen ogsaa blive skarpere. Udvikles der paa hver af Pladerne det samme Antal Vegetationspletter, saa er dette et Tegn paa, at Udsædens Celler have været jævnt fordelte, og at Forsøget er tilfredsstillende udført. Bærer hver Plade derimod ikke det samme Antal Pletter, viser dette, at Cellerne ikke have været jævnt fordelte; men heraf følger dog ikke, at Forsøget er mislykket. det kan endog være gaaet ligesaa godt igjennem som i det første Tilfælde. Sagen er den, at der slet

ikke fordres, at Cellerne skulle være jævnt fordelte, men kun at de blive saaledes adskilte fra hverandre, at enhver for sig kan faa Plads til at danne sin Vegetationsplet uden at være udsat for at støde sammen med andre. Denne Kontrolprøve giver følgelig kun Svar til den ene Side.

Den eneste Vej, ad hvilken vi kunne erholde fuldstændig Sikkerhed for, om en Vegetationsplet er dannet af een eller af flere Celler, er den at foretage Dyrkningen i et fugtigt Kammer. Jeg har udført Forsøget paa følgende Maade: Nogle faa Gjærceller bleve som sædvanlig godt fordelte i den flydende Næringsgelatine, og derpaa blev der af denne Blanding udbredt en temmelig tynd Hinde paa et Dækglas, som fæstnedes saaledes til et af de p. 53 omtalte Kamre, at Gelatinehinden kom til at vende nedad. Dækglasset, Kammeret og kort sagt alle de Apparater, der benyttedes, vare i Forvejen flammerensede. Saasnart Gelatinen var stivnet, opsøgte jeg et Par Celler, som havde et kraftigt Udseende, og hvis Beliggenhed i Præparatet var gunstig for Udviklingen af særskilte Kolonier; jeg mærkede mig deres Stilling og anbragde derpaa Kammeret i Thermostaten ved c. 25° C. Efter nogle faa Timers Forløb var Knopskydningen i Gang. Idet jeg med korte Mellemrum underkastede Præparatet en mikroskopisk Undersøgelse, kunde jeg Skridt for Skridt følge Udviklingen og saaledes erholde sikker Oplysning, om hvorvidt de Kolonier, som nu efterhaanden udvikledes, hver stammede fra een eller fra flere Celler. Efter 24 Timers Forløb kunde Vegetationspletterne skimtes med blotte Øjne; de havde en rund Form og vare lysgraaladne; efter 36 Timers Forløb vare de saa store som smaa Knappenaalshoveder. Paa disse senere Stadier er Undersøgelsen meget let, den bestaar nemlig kun deri, at der efterses, om der i Koloniernes Nærhed udvikles andre, som kunne smelte sammen med de først iagttagne. Da vor Næringsgelatine danner en fast Bund, hvori de udsaaede Celler indstøbes, skader det ikke, om der i Præparatet findes flere af disse, naar nogle af dem blot ligge saa isolerede, at de have tilstrækkelig Plads til at danne hver sin Koloni, uden at en Sammensmeltning med andre kan indtræde. Benyttede man en Vædske til Kulturerne, vilde en Sammenflyden derimod finde Sted; man vilde da kun kunne naa Maalet ved at udsaa een eneste Celle, og Opgaven vilde følgelig blive meget vanskeligere. Naar Koch's Methode anvendes med den her beskrevne Tillæmpning, har man deri et fuldstændigt sikkert Middel til at erholde en Renkultur.

Efterat disse, fra deres første Anlæg iagttagne Vegetationspletter vare traadte tydeligt frem for Øjet, blev der fra hver ved Hjælp af en i Forvejen glødet Platintraad hurtigt overført nogle Celler i Kolber med steriliseret Urt. Hvis Pletterne, som benyttes til Infektionen, kun tilhøre een Art, ville de deraf dannede Vegetationer i Kolberne stemme overens; tilhøre de derimod flere, vil der naturligvis ogsaa blive Forskjel paa Kolbernes Indhold.

I Forsøgene med den omtalte Tillæmpning indtræder først Usikkerheden paa det Punkt, da Dækglasset løftes op fra Kammeret, og Overførelsen i Kolberne foregaar; en Infektion fra Luften bliver da mulig. Faren er imidlertid kun ringe, naar Forsøgene udføres hurtigt og i et renligt Værelse med rolig Luft. Dette viste de i de først beskrevne Forsøg benyttede Hinder af Næringsgelatine; disse havde hver et Fladeindhold af c. 160 Kvadrat-Centim., og modtoge dog ingen anden Infektion fra Luften end Skimmel, nemlig hver Hinde i Gjennemsnit 1 spiredygtig Spore. Pag. 57 blev det ligeledes berørt, hvor ringe Faren for Infektion fra Luften er, naar man indretter sig paa en fornuftig Maade. Man kan forøvrigt ogsaa her anstille en Prøve, nemlig ved i den Tid, Experimentet udføres, at lade Skaale med steriliseret Olurt henstaa til at opfange, hvad Luftens Støv maatte føre med sig. Paa denne Maade vil man navnlig kunne erholde Besked, om der var Saccharomyces-Arter tilstede eller ej. Bakterier og Skimmelsvampe ængste os ikke saa meget; thi dem ville vi med meget større Lethed kunne opdage, hvis de maatte have sneget sig ind i vore Kulturer.

Pag. 59 blev det omtalt, at der var en lille Forskjel imellem de paa samme Gelatinehinde dannede Vegetationspletter af Sacch. apiculatus og af Sacch. cerevisiæ. Jeg gjentog disse Forsøg for at erfare, om de af forskjellige Gjærarter under de nævnte Forhold udviklede Vegetationspletter frembøde konstante makroskopiske Skjelnemærker. Hvis dette var Tilfældet, vilde man nemlig heri have en udmærket Hjælp til Analysen. Det viste sig imidlertid, at der for de undersøgte Arters Vedkommende ingen kjendelig Forskjel traadte frem; i Reglen var det mig endog ikke muligt at skjelne en Plet, som tilhørte Sacch. apiculatus fra en anden, der var dannet af Sacch. cerevisiæ eller af Sacch. Pastorianus. Flere af Arterne stemmede ogsaa mikroskopisk nøje overens under de givne Forhold; det var derfor ejheller ad den Vej muligt at foretage nogen endog kun tilnærmelsesvis sikker Bestemmelse. Herfra undtages dog, som ovenfor anført, Sacch. apiculatus, der bestandig bevarede sin karakteristiske Citronform og herved med Lethed skjælnedes fra alle andre.

I mine Undersøgelser over Alkoholgjærsvampene har jeg efterhaanden inddraget et temmelig stort Antal Arter. Materialet hertil erholdt jeg for største Delen i Laboratoriets Nærhed, i de tilgrændsende Haver og i kjøbenhavnske Bryggerier og Brænderier, men jeg fik ogsaa talrige Prøver sendt fra Udlandet, og endnu flere hjembragde jeg selv fra en Rejse i Vogeserne, hvor jeg i Vinhøstens Tid opholdt mig for at studere Vingjæringen. Som en god og meget bekvem Fremgangsmaade til paa Rejser at opbevare Prøver af Gjær kan jeg anbefale følgende: Vedkommende Gjær hældes ud paa et lille Stykke Filtrerpapir, som derpaa lægges sammen som to Blade i en Bog saaledes, at Gjæren kommer til at ligge imellem disse i et meget tyndt Lag. Ved Hjælp af et nyt Stykke Filtrerpapir opsuges saa meget af Vædsken som muligt, og derefter lægges Præparatet ind i et Par Omslag, der ligeledes ere lavede af Filtrerpapir. Dette maa i alle Tilfælde være flammerenset, førend det bruges. Naar Præparatet paa denne Maade er godt indpakket, lader man det helst ligge en Ugestid ved almindelig Stuevarme og udsat for Luftens Paavirkning. Derefter tages det yderste Omslag bort for at fjerne det Støv, som Luften i Værelset efterhaanden har aflejret paa det, og det nu næsten tørre Gjærpræparat kan i denne Tilstand gjemmes i en Skuffe i flere Maaneder, uden at Cellerne miste deres Livskraft. Har man, som det jo let hændes paa Rejser, ikke Lejlighed til at lade Præparatet henligge en Tid i Værelset til Tørring, er der heller ingen Fare for strax at pakke det ned i Kufferten, navnlig naar man i Forvejen ved Presning med Filtrerpapir har fjernet saa megen Fugtighed som mulig. Ved Hjælp af den beskrevne Fremgangsmaade kan man med ringe Bekostning og uden stort Besvær i en almindelig Brevkonvolut sende Gjærprøver lange Vejlængder. En stor Del af det Materiale, jeg har benyttet til mine Studier, har som sagt gjort Rejsen til Laboratoriet paa denne Maade.

Til i længere Tid at opbevare saadanne Prøver har jeg ligeledes med Held anvendt en steriliseret Vædske, der bestod af almindelig Ølurt, hvortil der var sat c. 10 Vol. % Alkohol og lidt Vinstensopløsning. Da Gjærcellerne, naar de anbringes heri, regelmæssig fremkalde en svag Gjæring, maa Flaskerne, hvori Vædsken og Gjæren anbringes, kun være halvt fyldte. En væsentlig Dyd ved denne Vædske er den, at man ikke her bliver forulempet af nogen stærk Gjæring; man kan derfor lukke vedkommende Flaske strax, efterat Gjæren er kommen deri, uden at der er Fare for en Sprængning. Herved adskiller den sig paa en fordelagtig Maade

fra Saccharose-Opløsninger, der forøvrigt ogsaa egne sig godt til at opbevare Gjær i længere Tid.

I mine foran beskrevne Filtrerpapirspræparater bevarede Gjærcellerne i flere Tilfælde deres Livskraft i 20 Maaneder, og det er muligt, at nogle Arter kunne leve endnu længere under disse Forhold. Unge, kraftige Celler holde regelmæssig længere ud end gamle, svage af samme Art. I ingen af mine Prøver vare Cellerne døde før Udløbet af de første 5 Maaneder. Naar vedkommende tørrede Gjærprøve indeholdt flere Arter, men saaledes at en enkelt var i Overvægt, vedblev denne i Reglen ogsaa at være det i den Avl, der dannedes, hvis Præparatet i Løbet af de første 2—3 Maaneder var blevet overført i en Næringsvædske. Henlaa det derimod i længere Tid, hændte det ikke sjældent, at de nydannede Celler enten udelukkende eller for største Delen kom til at bestaa af en hel anden Art, end man havde ventet, og altsaa af en Art, der ved Forsøgets Begyndelse udgjorde en underordnet Bestanddel af den tørrede Gjær. Det vil sige, de forskjellige Arter ere under Udtørringen ikke lige levedygtige, nogle svækkes i højere Grad end andre, og der er ogsaa Forskjel paa det Maal af Tid, i hvilket de kunne bevare deres Liv, naar de paa den beskrevne Maade blive indtørrede. Herved opstaar der atter et kompliceret, men interessant Spil af Muligheder, naar saadanne indtørrede og mere eller mindre svækkede Gjærceller, tilhørende forskjellige Arter, komme sammen i en Næringsvædske og begynde Konkurrencen. Ved at benytte sig af de her skildrede Forhold vil man ofte blive istand til at begunstige en bestemt Art, saa at man kan erholde en Gjærmasse, hvoraf denne udgjør Hovedbestanddelen. Man kan følgelig ad denne Vej komme Renkulturen et Skridt nærmere. Ønsker man at afgjøre, om Cellerne ere levende eller ej, da er det ikke nok at anbringe dem i en gunstig og tilstrækkelig luftet Næringsvædske, men man maa tillige sørge for en heldig Temperatur. Ofte har jeg erfaret, at Gjærceller, som ikke kunde komme til Udvikling ved almindelig Stuevarme, selv om de forøvrigt havde gunstige Ernæringsvilkaar, derimod efter nogle Dages Forløb formerede sig ved en livlig Knopskydning, naar de i Thermostaten bleve udsatte for en Temperatur af c. 27° C.

Jeg fremhæver dette, da de Forskere, der have beskjæftiget sig med Spørgsmaal af lignende Art, ikke have lagt tilstrækkelig Vægt herpaa. Ved en anden Lejlighed vil jeg selv atter komme tilbage til disse Forhold.

I den foran omtalte alkoholrige og sure Næringsvædske holdt Gjærcellerne sig lige saa godt som i Filtrerpapirs-Præparaterne;

i flere Tilfælde bevarede de deres Livskraft over 20 Maaneder. At Arterne ogsaa under disse Opbevaringsforhold forholde sig indbyrdes forskjellige er rimeligt; jeg har dog ikke anstillet særlige Forsøg i den Retning. Nogle af de Gjærprøver, som jeg førte hjem med mig fra Vogeserne, opbevarede jeg saavel i den netop omhandlede Vædske som ogsaa i den gjærende Vin, hvorfra de stammede. Det viste sig da, at de ikke holdt sig saa længe levende i Vinen som i den anden Vædske. Aarsagen hertil maa søges i de to Vædskers forskjelligartede Sammensætning. I Vinen har rimeligvis Næringen været opbrugt af de der i Forvejen dannede Gjærceller, og der har vel næppe fundet nogen Formering Sted. Den anden Vædske indeholdt derimod ved Siden af den store Alkohol- og Syremængde megen Næring i Urten; ved Knopskydning udvikledes derfor ret talrige unge Celler, og det er vistnok disse, der i den lange Tid (17 Maaneder) have holdt sig levende. I ingen af Vædskerne optraadte der Bakterier, Skimmelsvampe eller Sacch. Mycoderma.

De i det følgende Afsnit beskrevne Dyrkningsforsøg for at bringe Gjærceller til at udvikle Askosporer ere, naar intet Andet bemærkes, udførte ved Hjælp af de pag. 32 omtalte Gibsblokke og med unge, kraftige Celler. Udsæden hertil blev forberedt paa følgende Maade: Efterat vedkommende Celler i nogen Tid vare blevne dyrkede i Ølurt (c. 14 % Ball.) ved almindelig Stuevarme, bleve unge, kraftige Celler hertra overførte i ny Urt, men af samme Beskaffenhed som den tidligere, og saaledes dyrkede i henved 1 Døgn ved 26—27° C. De paa denne Maade avlede Gjærceller bleve udsaaede paa Blokkene, og naar disse havde suget sig fulde af Vand, saa at deres Overflader viste sig svagt glindsende, bleve de stillede ind i Thermostaten ved de ønskede Temperaturer. Min Opgave gik ud paa at komme til Klarhed over den Indflydelse, som de forskjellige Varmegrader maatte udøve paa Dannelsen af Askosporerne, og dernæst at afgjøre, om Arterne forholdt sig ens i den nævnte Retning eller ej, og hvis de viste Differenser, da at bestemme disse. Jeg maatte saaledes for hver enkelt af mine foran omtalte Renkulturer undersøge, ved hvilke Varmegrader den nævnte Udvikling ikke længere kunde indtræde, altsaa udfinde Grændsetemperaturerne, og dernæst bestemme, hvor Optimumstemperaturen fandtes, og endelig, for at faa Kurven fuldstændig, foretage Undersøgelser ved et tilstrækkeligt Antal af de imellem Grændserne liggende Temperaturgrader. For at erholde

en saa sikker Maalestok som muligt, valgte jeg til mine Bestemmelser det Tidspunkt, hvor det under de givne Dyrkningsforhold for første Gang er muligt at finde utvivlsomme Anlæg. Hvad jeg herved forstaar, har jeg afbildet paa Kobbertavlen, Fig. 1 og 6 c. For en flygtig Betragtning kunde det synes at have været rimeligere, at der som Maalestok var valgt det Tidspunkt, da den modne Spore var udviklet; det er imidlertid næppe muligt med Bestemthed at afgjøre, naar dette indtræder, eller overhovedet at se, om en foreliggende Spore er moden eller ej. Det førstomtalte Forhold frembyder derimod ikke saadanne Vanskeligheder.

Askosporer udvikles ligeledes, naar vedkommende Gjærceller anbringes paa Overfladen af steriliseret, stivnet Gelatine, som, saalænge Forsøget varer, holdes i et fugtigt Rum. Det er bekvemt at benytte Objektglas hertil; paa disse stryges den flydende Gelatine i et ikke for tyndt Lag; om der er Næringsvædske indblandet deri eller ej synes ikke at have nogen Betydning, i begge Tilfælde opnaaede jeg en rigelig Avl af Askosporer. Af saadanne Objektglas kan man i et Stativ anbringe en temmelig Mængde under samme Klokke. Det er en forholdsvis hurtig og bekvem Maade til paa een Gang at foretage en større Række Forsøg.

Forinden jeg slutter disse Meddelelser, kan jeg endelig bemærke, at jeg ved i en Tid at dyrke nogle Arter i Gjærvand, der af og til blev luftet, da ogsaa her erholdt Avl af Askosporer.

Experimenter.

De sex Former, hvormed de i det Følgende omhandlede Experimenter ere udførte, kunne henføres til de tre gamle Arter, Sacch. cerevisiæ, Sacch. Pastorianus og Sacch. ellipsoideus. Indtil videre betegnes de saaledes:

Sacch. cerevisiæ I.

Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus II, Sacch. Pastorianus III.

Sacch. ellipsoideus I, Sacch. ellipsoideus II.

Renkulturerne af dem bleve fremstillede ved Hjælp af de i det forrige Afsnit meddelte Methoder.

Efter det gamle Skema vilde de nævnte Gjærformer blive opstillede som tre eller maaske fire selvstændige Arter, og det vilde da være temmelig ligegyldigt til hvilke, man knyttede Reess's Navne. Af enhver af de ovennævnte Arter (med dette

Navn vil jeg for Kortheds Skyld, men uden at foregribe Undersøgelsernes endelige Resultater, herefter kalde dem) kan der nemlig ved passende Behandling udvikles Former, der kunne henføres til alle de i Reess's System opførte askosporedannende Species. De af Pasteur angivne Karakterer have ikke større Værdi.

Mine foranstaaende Grupperinger betyde kun, at de med det samme Arts-Navn betegnede Gjærsvampe kunne henføres til den nævnte Art hos Reess, men der siges hermed ingenlunde, at de til den samme Gruppe henførte Arter have samme Udspring og stamme fra samme Rod. Jeg henviser her atter til Bemærkningerne pag. 56 om Species, Varietet og Afændring.

I mine senere Afhandlinger vil der efterhaanden blive behandlet et større Antal Arter, og naar de nødvendige Undersøgelser ere blevne afsluttede, vil jeg tydeligt angive de fundne Grændser for de tilstedeværende Species og give disse deres systematiske Navne.

Nedenfor gjennemgaas de sex Arter i den Orden, hvori de bleve nævnte; de tilsvarende Figurer paa Tavlerne ere ligeledes fremstillede i samme Orden.

Sacch. cerevisiæ I.

Denne Art udgjorde Hovedbestanddelen af en Øl-Overgjær, som jeg for nogle Aar siden modtog fra et Bryggeri i Edinburgh. Senere har jeg ogsaa erholdt den fra et Bryggeri i London. Det er en kraftig Overgjærform. Paa medfølgende Kobbertavle, Fig. 1, er der fremstillet Exempler paa Celler med Askosporer. Disse ere som hos alle Saccharomyces-Arterne saavel ved paafaldende som ved gjennemfaldende Lys vandgraa og mere eller mindre kuglerunde; deres Størrelse varierer fra $2^{1}/_{2}$—6 Mikromillim.; Yderpunkterne ere dog sjeldne. I Almindelighed findes der 1—4 i hver Modercelle, kun rent undtagelsesvis iagttog jeg 5. (Se Fig. 1 b). Sporens Væg ses i Reglen tydeligere hos denne end hos de efterfølgende Arter. Disses Sporer have vistnok ogsaa i Almindelighed en stærkere Lysbrydning end den her omhandlede Arts.

Her som overhovedet hos alle Arterne er det almindeligt, at Askosporerne i en og samme Modercelle kunne have indbyrdes forskjellig Størrelse. Ligeledes iagttoges det hyppigt, at samme Modercelle paa een Gang har udviklet Askosporer og udskudt en Knop. Figurerne af nogle af de efterfølgende Arter vise endog det Tilfælde, at ikke blot Modercellen, men ogsaa Knoppen har udviklet Sporer. Grupperingen af Sporerne er den samme hos alle

Arterne. Afbildningerne give en fyldig Forestilling om de Modifikationer, der kunne finde Sted heri.

I Fig. 1 c er der afbildet Celler med uudviklede Askosporer, nemlig det Stadium, der, som foran meddelt, blev benyttet til Bestemmelsen af den Tid, der medgaar til Udviklingen af Askosporerne, naar de vegetative Celler under de beskrevne Forhold udsættes for en eller anden bestemt Temperaturs Indvirkning. Fig. 1 a fremstiller en ejendommelig Udviklingsform, der ret ofte optræder. Cellerne ere her ved Vægge delte i flere Partier, som hvert for sig kunne udskyde Knopper. Jeg har i mine Optegnelser betegnet denne Udvikling som Skillevægdannelse, og med dette Navn vil den ogsaa blive kaldt hos de andre Arter, hvor jeg har iagttaget den. Til et nøjere Studium af, hvorledes den fremkommer, og af dens Betydning har jeg paa Grund af nærmere liggende Undersøgelser endnu ikke havt den fornødne Tid. Rimeligvis have tidligere Forfattere ogsaa iagttaget disse Dannelser, men sammenblandet dem med den egentlige Askosporedannelse.

Nedenfor meddeles, med hvilke Tidsmellemrum Udviklingen af Askosporerne foregaar, naar de vegetative Celler underkastes den p. 65 omtalte Behandling; denne var saavel for Sacch. cerevisiæ I, som for de efterfølgende fem Arter den selvsamme.

Ved $37^1/_2{}^0$ C. udviklede Askosporerne sig ikke.
- 36-37^0 C. viste de første tydelige Anlæg sig efter 29 Timers Forløb
- 35^0 C. . . . . 25 —
- $33^1/_2{}^0$ C. 23 —
- 30^0 C. . . . . 20 —
- 25^0 C. . . . . 23 —
- 23^0 C. . . . . 27 —
- $17^1/_2{}^0$ C. 50 —
- $16^1/_2{}^0$ C. 65 —
- 11-12^0 C. 10 Døgn.
- 9^0 C. udviklede Askosporerne sig ikke.

Sacch. Pastorianus I.

Med dette Navn betegnes en Gjærsvamp, som jeg ret hyppig opfangede i Luftens Støv i et Bryggeri i Kjøbenhavn[1]). Naar den dyrkes i Urt, giver den Undergjæring og udvikler Celler, som

---

[1]) Emil Chr. Hansen, Undersøgelser over de Organismer, som til forskjellige Tider af Aaret findes i Luften i og omkring Carlsberg, og som kunne udvikle sig i Ølurt. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet. I B. 4 Hefte, 1882, p. 381).

ligne Afbildningerne paa Tavle XI i Pasteur's »Études sur la bière« og Fig. 11—12, Tavle II i Reess's »Botanische Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze«. Askosporerne (se min Kobbertavle Fig. 2) have i Almindelighed en Størrelse af $1^1/_2$—$3^1/_2$ Mikromillim.; kun yderst sjelden optræde de med en Diameter af indtil 5 Mikromillim. Som sædvanlig findes hyppigst det for Saccharomyces-Arterne normale Antal i hver Celle, nemlig 1—4, temmelig ofte iagttages dog ogsaa Celler hver med et større Antal, nemlig 5-10. Fig. 2 b giver Exempler derpaa. Ligesom nogle andre Arter er denne meget tilbøjelig til at udvikle mycelieagtige, grenede Kolonier af langstrakte Celler, naar den en Tid først har været udpint i Saccharose og derefter overføres i Urt eller i Gjærvand.

Ved at dyrke disse Kolonier i Gjærvand lykkedes det mig at bevare de langstrakte Celler. I Kulturer i Urt give de hurtig Plads for Udviklingen af ovale Celler. Det er navnlig ved at benytte en saadan Avl af langstrakte Celler fra Gjærvand til Udsæd paa Gibsblokke, at jeg opnaaede, at flere hver udviklede 5—10 Sporer. Ogsaa Skillevægdannelsen iagttog jeg hos denne Art. (Fig. 2 a).

Ved $31^1/_2$ ° C. udviklede Askosporerne sig ikke.

- $29^1/_2$-$30^1/_2$ ° C. viste de første tydelige Anlæg sig efter 30 T. F.
- 29° C. . . . . 27 —
- $27^1/_2$ ° C. . . . . 24 —
- $23^1/_2$ ° C. . . . . 26 —
- 18° C. . . . . 35 —
- 15° C. . . . . 50 —
- 10° C. . . . . 89 —
- $8^1/_2$ ° C. . . . . 5 Døgn
- 7° C. . . . . 7 —
- 3-4° C. . . . . 14 —
- $^1/_2$ ° C. udviklede Askosporerne sig ikke.

Sacch. Pastorianus II.

Ligesom den foregaaende blev denne Art temmelig almindelig iagttagen i de Analyser, som jeg i Aarene 1878—1881 foretog af Luftens Støv i det foran omtalte kjøbenhavnske Bryggeri. Dens Vegetation i Urt stemmer ogsaa overens med Pasteur's og Reess's citerede Afbildninger af Sacch. Pastorianus. Sammenlignet med den foregaaende ere dens Celler i Reglen lidt større; men Forskjellen er i hvert Fald ikke fremtrædende, og sammenblandes de to Arter, saa vil det ikke være muligt ved direkte mikroskopiske Undersøgelser at afgjøre, om man har een eller flere for sig. I Modsætning til den foregaaende fremkalder den svage Overgjæringsfænomener.

Den maa derfor vel være forskjellig fra den Sacch. Pastorianus, hvormed Pasteur har experimenteret, thi om denne siges i »Études sur la bière«, at den er en Undergjærform. Dens Askosporer ere fremstillede i min Fig. 3. Ved a ses Skillevægdannelser, ved b to Celler med et større Antal Askosporer end det normale, i den ene findes 6, i den anden 7, og ovenover disse tilvenstre er afbildet en kort, pølsedannet Celle med 5. Denne viser, at Askosporerne kunne opnaa en betydelig Størrelse, ogsaa naar en Modercelle har fostret et Antal af dem, der er ud over det sædvanlige. Deres Størrelse varierer fra 2—5 Mikromillim.; Yderpunkterne ere sjeldne, navnlig gjælder dette om Størrelserne 4—5 Mikromillim.

Ved 29° C. udviklede Askosporerne sig ikke.		
- 27-28° C. viste de første tydelige Anlæg sig efter	34	T. F.
- 25° C.	25	—
- 23° C.	27	—
- 17° C.	36	—
- 15° C.	48	—
- 11½° C.	77	—
- 7° C.	7	Døgn
- 3-4° C.	17	—
- ½° C. udviklede Askosporerne sig ikke.		

Sacch. Pastorianus III.

Denne Art har jeg udskilt af kjøbenhavnsk undergjæret Øl, som led af den Sygdom, man kalder Gjærtykhed. Den fremkalder kraftigere Overgjæringsfænomener end den nærmest foregaaende. Under Vegetationen i Urt have dens Celler samme Udseende som de to andre Arters, henhørende til denne Gruppe, navnlig ligne de meget nøje Sacch. Pastorianus I. I Kulturer paa Gibsblokke udvikle de ikke blot Askosporer (Fig. 4), men ogsaa i Lighed med de foregaaende Skillevægdannelser (Fig. 4 a); Celler hver med 5—10 Askosporer (Fig. 4 b) forekom ligeledes. Sporerne maalte 2—4 Mikromillim.; Størrelserne 3½—4 vare sjeldne.

Ved 29° C. udviklede Askosporerne sig ikke.		
- 27-28° C. viste de første tydelige Anlæg sig efter	35	T. F.
- 26½° C.	30	—
- 25° C.	28	—
- 22° C.	29	—
- 17° C.	44	—
- 16° C.	53	—
- 10½° C.	7	Døgn.
- 8½° C.	9	—
- 4° C. udviklede Askosporerne sig ikke.		

Sacch. ellipsoideus I.

Den fandtes i Forening med andre Saccharomyces-Arter paa Overfladen af modne Druer, som jeg i Vinhøstens Tid plukkede i Vogeserne. Naar den dyrkes i Urt eller i Vindruemost, ligne Cellerne nærmest Reess's og Pasteur's Afbildninger af Sacch. ellipsoideus (Pasteur's »ferment alcoolique ordinaire du vin«). Ligesom de øvrige Arters kunne de ogsaa blive pølseformede og ved forskjellig Behandling overhovedet skifte Form. Reess's og Pasteur's Bestemmelser give derfor ligesaa lidt her, som nogetsteds paa dette Omraade bestemte Holdepunkter.

Sporerne har jeg afbildet i Fig. 5; en Skillevægdannelse i Fig. 5 a. Sporernes Diameter er 2—4 Mikromillim.; meget sjelden dog $3^1/_2$—4.

Ved $32^1/_2{}^0$ C. udviklede Askosporerne sig ikke.
- $30^1/_2$-$31^1/_2{}^0$ C. viste de første tydelige Anlæg sig efter 36 T. F.
- $29^1/_2{}^0$ C. . . . . 23 —
- 25^0 C. . . . . 21 —
- 18^0 C. . . . . 33 —
- 15^0 C. . . . . 45 —
- $10^1/_2{}^0$ C. . . . . $4^1/_2$ Døgn
- $7^1/_2{}^0$ C. . . . . 11 —
- 4^0 C. udviklede Askosporerne sig ikke.

Sacch. ellipsoideus II.

I det foran omtalte gjærtykke Øl optraadte denne Art sammen med Sacch. Pastorianus III og en Sacch. cerevisiæ. Dyrkes Cellerne i Urt, saa have de saavel Lighed med Sacch. ellipsoideus I, som med Sacch. cerevisiæ. Fig. 6 fremstiller Celler med modne Askosporer; Fig. 6 c Anlægene dertil; det er dette Udviklingstrin, som har tjent til Bestemmelserne i nedenstaaende Tabel. Askosporerne vare 2—5 Mikromillim., Størrelserne fra 4—5 vare som sædvanlig ogsaa her sjeldne.

Ved 35^0 C. udviklede Askosporerne sig ikke.
- 33-34^0 C. viste de første tydelige Anlæg sig efter 31 T. F.
- 33^0 C. . . . . 27 —
- $31^1/_2{}^0$ C. . . . . 23 —
- 29^0 C. . . . . 22 —
- 25^0 C. . . . . 27 —
- 18^0 C. . . . . 42 —
- 11^0 C. . . . . $5^1/_2$ Døgn
- 8^0 C. . . . . 9 —
- 4^0 C. udviklede Askosporerne sig ikke.

I mine ovenfor citerede Afbildninger har jeg bestræbt mig for, saa vidt muligt, at give Exempler paa de forskjellige Former af askosporeførende Celler, hvormed hver af de omhandlede Arter kunne optræde, naar de dyrkes paa den beskrevne Maade. De ere derfor tegnede efter talrige Præparater og indskrænke sig følgelig ikke til det, der er det Hyppigste, men tage tillige Undtagelserne med.

Et Blik paa Tavlen viser hurtigt, at væsentlig de samme Former, Grupperinger og Størrelseforhold kunne optræde hos alle Arterne. Hos Sacch. cerevisiæ I opnaa Sporerne dog en Størrelse, der er Noget udover den, der hidtil er iagttagen hos de andre, nemlig 6 Mikromillim., medens den største Diameter hos de andre er 5 Mikromillim.; men fra dette Yderpunkt har man en hel Skala af Sporer, hvis Størrelse efterhaanden bevæger sig nedad til henimod 2 Mikromillim. Vi have saaledes ogsaa hos denne Art de Størrelser, der for de øvrige fem ere hyppige, nemlig $3^1/_2$—$2^1/_2$ Mikromillim. Hos Sacch. Pastorianus I iagttog jeg Sporer, som kun maalte $1^1/_2$ Mikromillim.; de vare altsaa $^1/_2$ Mikromillim. mindre end de mindste, der optraadte hos de øvrige Arter; jeg tvivler imidlertid ikke om, at man ved fortsat Søgen ogsaa vil kunne finde ligesaa smaa Sporer hos disse, navnlig gjælder dette om de tre sidst beskrevne.

Tænke vi os, at de paa Tavlen fremstillede Sporer sammenblandes, saa ville vi, naar vi ikke have Andet end selve Sporerne at holde os til, altsaa deres Størrelseforhold, Gruppering i Modercellen og Udseende, ikke kunne faa ret meget at vide om, hvilke Arter vi have for os. De faa store Sporer paa 6 Mikromillim. ville vi bestemme som Sacch. cerevisiæ I og de smaa paa $1^1/_2$ som Sacch. Pastorianus I; men hermed er ogsaa al vor Viden forbi, og, som ovenfor anført, have vi jo ikke en Gang paa disse to Punkter rigtig Sikkerhed. Hvad den store øvrige Mængde angaar, da kunne vi ikke have nogensomhelst Formodning om, hvorledes vi skulle gruppere dem.

Holde vi derimod fast ved det gamle System og lade os lede deraf, saa ville vi endog i de Former og Størrelseforhold, hvormed een og samme Arts askosporeførende Celler optræde, finde Exempler paa alle eller idetmindste paa de fleste af Systemets askosporedannende Arter. Fig. 2 viser dette tydeligt. Her findes Celler, der kunne bestemmes som Sacch. cerevisiæ, Sacch. ellipsoideus, Sacch. exiguus og Sacch. Pastorianus, altsaa fire af Systemets Arter repræsenterede i een. Ogsaa de andre Figurer give Exempler i den Retning. Idet Reess's System her kritiseres, maa det ikke

glemmes, at hans Bog for sin Tid var et fortjenstfuldt Arbejde; navnlig findes deri et dygtigt Angreb paa den da herskende Udskejelse i Læren om Pleomorfismen hos Svampene.

Ifølge det Foregaaende kunne vi allerede nu slaa fast, at hverken Cellens Form, Størrelseforhold eller Udseende for sig ere tilstrækkelige til at give Arts-Karakterer, og at det Samme gjælder om Askosporerne.

Taget fra et andet Synspunkt yder Cellens Form derimod vigtige Skjelnemærker. Det blev berørt saavel i Begyndelsen af dette Afsnit som ogsaa i min første Meddelelse fra 1882 om de nye Methoder til Undersøgelsen af Saccharomyces-Arterne, at de forskjellige Arters Celler, naar de underkastes en vis Behandling, da kunne antage forskjellige Former saaledes, at f. Ex. ovale Celler tvinges til at udvikle langstrakte, og disse til at udvikle ovale. Her er det atter den forskjellige Maade, hvorpaa Arterne reagere overfor de samme ydre Paavirkninger, der give os værdifulde Oplysninger.

De foran meddelte Forsøg over Udviklingen af Askosporerne have vist, at denne er afhængig af Temperaturen saaledes, at den indenfor de Grændser, hvor den kan finde Sted, foregaar langsomt ved de lave Temperaturer og hurtigere ved de højere indtil et vist Punkt, hvorfra den atter bliver langsommere for snart at standse. Hos ingen af de sex undersøgte Arter fandt denne Udvikling Sted ved lavere Temperaturer end en Varmegrad mellem $^1/_2$ og 3^0 C., og den højeste Temperatur, ved hvilken den endnu indtraadte, var en Varmegrad i Nærheden af $37^1/_2{}^0$ C. Paa Tab. I og II er Udviklingsgangen for de sex Arter fremstillet som ligesaa mange Kurver, der hver ere betegnede med sit tilsvarende Artsnavn. Varmegraderne ere afsatte paa Abscisseaxen, og de Tidsrum, der ved de paagjældende Temperaturer fordres til Udviklingen af Askosporerne, som Ordinater. I alle sex Tilfælde faa Kurverne hovedsagelig samme Form. De danne krumme Linier, som fra den laveste Varmegrads Ordinat stige ned mod Abscisseaxen og derefter atter fjerne sig lidt fra denne. Kardinalpunkterne, navnlig de af Maximums- og Minimumstemperaturerne bestemte, give derimod karakteristiske Skjelnemærker mellem Arterne.

Hos Sacch. cerevisiæ I standser saaledes denne Udvikling ved en Temperatur mellem 9 og 11 og ved 37—$37^1/_2{}^0$ C.

Hos Sacch. Pastorianus I standser den ved en Temperatur mellem $^1/_2$ og 3 og ved en Temperatur mellem $30^1/_2$ og $31^1/_2{}^0$ C.

Hos Sacch. Pastorianus II fandtes Minimumstemperaturen ligeledes mellem $^1/_2$ og 3° C., men Maximumstemperaturen er her lavere end hos den foregaaende, nemlig i Nærheden af 28° C.

Sacch. Pastorianus III har samme Maximumstemperatur som Sacch. Pastorianus II; men dens Minimumstemperatur er en anden, den ligger nemlig mellem 4 og $8^1/_2$° C.

Væsentlig den samme Minimumstemperatur fandtes ogsaa hos Sacch. ellipsoideus I og II; hos den første laa Maximumstemperaturen imidlertid mellem $31^1/_2$ og $32^1/_2$ og hos den sidste mellem 34 og 35° C.

Optimumstemperaturen fandtes hos Sacch. cerevisiæ I nær 30° C.; kun lidt lavere var den hos Sacch. ellipsoideus II.

Hos Sacch. Pastorianus I iagttoges den i Nærheden af 27° C., hos Sacch. Pastorianus II og III samt Sacch. ellipsoideus I i Nærheden af 25° C.

Nær ved Maximum krævede Udviklingen c. 30 Timer eller derover. Omkring 25° C. var der ikke stor Forskjel paa den Tid, som Udviklingen hos de undersøgte Arter krævede. Ved de lavere Temperaturer traadte Forskjellen derimod stærkere frem. Meget iøjnefaldende er den, naar Udviklingstiden ved $11^1/_2$° C. hos Sacch. cerevisiæ I sammenlignes med den tilsvarende Udviklingstid hos de andre Arter. Ved den nævnte Temperatur krævede Sacch. cerevisiæ I nemlig 10 Døgn for at udvikle Askosporer, hvorimod Sacch. Pastorianus I og II brugte mindre end 4, Sacch. Pastorianus III mindre end 7, Sacch. ellipsoideus I mindre end $4^1/_2$ og Sacch. ellipsoideus II mindre end $5^1/_2$ Døgn. Her som allevegne er det kun de ved direkte Undersøgelse fundne Punkter i Kurverne, der ved Sammenligningerne benyttes.

Ifald alle Forsøgsrækkerne vare blevne udførte ved de samme Temperaturer, vilde der vistnok kunne være kommen flere oplysende Sammenligninger frem i den Retning. Da jeg benyttede Panum's store sammensatte Thermostat (beskreven i nærværende Tidsskrifts I B. 1 H., p. 48) lod det sig imidlertid ikke gjøre, og uden dette Apparat vilde jeg ikke have været i Stand til i en rimelig Tid at gjennemføre denne Undersøgelse; thi dels var Forsøgenes Antal stort, og de fleste strakte sig, som foranstaaende Tabeller vise, gjennem flere Døgn, ved Minimumsgrændsen bleve de endog fortsatte indtil 2 Maaneder, og dels blev der benyttet et temmelig betydeligt Antal Temperaturer mellem 0 og 38° C. Under disse Forhold kunde der følgelig ikke godt være Tale om at indrette en særskilt Thermostat for hver enkelt af de ønskede

Temperaturer; og med Hensyn til Bestemmelsen af Kurverne faar det naturligvis ejheller nogen Indflydelse.

I det foregaaende Afsnit blev der meddelt, at den til Askosporekulturerne anvendte Gjær ikke blot i alle Tilfælde bestod af unge, kraftige Celler, men af Celler, avlede under de samme Betingelser. Som det erindres blev den først dyrket en Tid ved almindelig Stuevarme i Urt, og unge, kraftige Celler herfra overførte i ny Urt af idetmindste hovedsagelig samme Beskaffenhed som den tidligere anvendte (c. 14% Ball.). Der blev bestandig anvendt de foran omtalte tohalsede Pasteurske Kolber. De sidstnævnte Kulturer bleve foretagne ved c. 27° C. i henved 1 Døgn. Alle disse Bestemmelser have deres Betydning. I Forsøgene viste det sig nemlig, at der er kjendelig Forskjel paa de erholdte Resultater, om Gjæren, der udsaas paa Gibsblokkkene, har været dyrket 1 eller 2 Døgn ved 27° C. I begge Tilfælde se dog de avlede Celler ud til at være kraftige og unge og have overhovedet væsentlig det selv samme Udseende. Efterfølgende Tabel viser Askosporernes Udviklingsgang, naar den til Kulturerne paa Gibsblokkene anvendte Gjær af Sacch. Pastorianus I har været dyrket 2 Døgn ved den nævnte Temperatur:

Ved 29° C. udviklede Askosporerne sig ikke.
- 28° C. viste de første tydelige Anlæg sig efter 36 T. F.
- 27° C. . . . . 29 —
- 23° C. . . . . 30 —
- 15° C. . . . . 54 —

Sammenholdes denne Tabel med den p. 69 gjengivne, der viser Udviklingsgangen, naar den benyttede Gjær stammer fra en Kultur ved den nævnte Temperatur af kun omtrent 1 Døgns Varighed, saa træder Forskjellen ved de høje Temperaturer strax frem. Hos Cellerne fra 2 Døgns Kulturen standser Udviklingen af Askosporer allerede ved en Temperatur mellem 28 og 29° C., hvorimod Cellerne fra 1 Døgns Kulturen endnu udvikle disse Formeringsredskaber ved 29½—30½° C. Ved 28° C. kræve Cellerne fra 2 Døgns Kulturen 36 Timer, og Cellerne fra 1 Døgns Kulturen kun lidt over 24 Timer til Dannelsen af Askosporer. Cellerne fra 2 Døgns Kulturen udviklede tilmed ved den sidste Temperatur kun et ringe Antal Sporer, hvorimod Cellerne fra 1 Døgns Kulturen gave en rig Udvikling. Det er rimeligvis den under den fortsatte Gjæring forøgede Alkoholmængde, der efterhaanden svækker Cellernes Evne i den nævnte Retning.

Disse Iagttagelser give Anledning til en særlig Undersøgelse over hvilke Betingelser, der ere de gunstigste for Udviklingen af

Askosporerne. Rimeligvis ville de forskjellige Arter ogsaa i den Retning forholde sig forskjellig. Denne Undersøgelse ligger imidlertid noget udenfor mit nærværende Arbejdes Plan, og den opsættes derfor til en senere Tid.

Selv om de foran omtalte Hensyn tages, og der overhovedet sørges for, saa vidt som muligt, at alle de Forsøg, hvis Resultater skulle sammenlignes, bestandig anstilles nøjagtigt paa samme Maade, ville Svingninger dog gjøre sig gjældende. Jeg har derfor gjentaget hver Forsøgsrække flere Gange, og de angivne Tal ere Middeltal, fundne ved Beregning af 3—4 Forsøg. Det ligger i Sagens Natur, at fysiologiske Undersøgelser af denne Art ikke kunne gaa med den ensformige Nøjagtighed som rent kemiske. Man kan ikke operere med en levende Organisme som med et dødt Stof; thi Organismen betyder en Uendelighed af mere eller mindre forskjellige Tilstande, hvilke hver for sig kunne faa Indflydelse paa Resultaterne af vore Experimenter. Det vil sige: den samme Organisme kan overfor de samme ydre Paavirkninger forholde sig forskjellig efter den vexlende Tilstand, hvori den befinder sig i det Øjeblik, da den underkastes Forsøget. Skulle vore Experimenter yde virkelige Bidrag til at udfinde Lovene, saa maa vi erindre dette, og vi maa idetmindste i Hovedtrækkene udklare Grændserne for os. Intet Resultat paa dette Omraade gjælder fuldt ud for alle Tilfælde, men kun indenfor visse Grændser, visse Betingelser, ikke blot udenfor Organismen, men ogsaa hos denne selv, og det er en væsentlig Opgave at bestemme og saa nøje som muligt at angive disse. Alt dette er egentlig i sig selv indlysende; dog have som Regel de fleste Arbejder over de lavere Organismers Fysiologi, hvorom Talen her er, indskrænket sig til at behandle de ydre Faktorers Indvirkning, og kun undtagelsesvis finder man Exempler paa, at der er taget Hensyn til Tilstanden af den eller de Organismer, hvormed der experimenteredes.

De i det Foregaaende meddelte Oplysninger hjælpe os til nogenlunde at forstaa, hvorledes Vildfarelserne og de modstridende Meninger, hvorpaa Literaturen om Askosporedannelsen hos Slægten Saccharomyces er saa rig, ere komne frem. Eidam har rimeligvis arbejdet med en ren eller temmelig ren Øl-Undergjær; den udvikler som Regel langsomt og sparsomt Askosporer; have nu Cellerne ovenikjøbet ikke været unge og kraftige, saa forstaas det let, at han kun opnaaede et negativt Resultat. Ogsaa Nattekulden eller

en uheldig Dyrkningsmaade vil kunne have hæmmet Udviklingen. Andre Forskere, som tvertimod opnaaede en rig og hurtig Udvikling, have opereret med saadanne Arter som Sacch. cerevisiæ I eller med vilde Gjærarter, der ere villige til at frembringe disse Formeringsorganer. At paavise, hvorledes Fejlene i hvert enkelt Tilfælde ere opstaaede, vil som oftest være umuligt; det har desuden ej heller stor Interesse. Om Brefeld's Vildfarelser er der talt i 1ste Afsnit.

P. 41 blev det berørt, at van Tieghem i en af sine Afhandlinger om Mucorineerne udtaler den ejendommelige Anskuelse, at Askosporedannelsen er en pathologisk Udvikling, der skyldes Bakteriers Indgriben. Det er imidlertid ikke vanskeligt at overbevise sig om, at han har været uheldig med sin nye Tydning. Indretter man f. Ex. Kulturerne paa Gibsblokkene med særlig Omhu, saa vil man her i Reglen erholde en rig Udvikling af Askosporer, uden at man ved den mikroskopiske Undersøgelse kan opdage en eneste Bakterie. Det samme er Tilfældet, naar man benytter de p. 66 beskrevne Objektglas med Gelatinehinder til Forsøgene.

For imidlertid at erholde en aldeles sikker Afgjørelse af, om Gjærceller kunne udvikle Askosporer eller ej, naar Bakterier ere udelukkede, anstillede jeg følgende Forsøg: I en 1/8 Liters Pasteursk Kolbe blev der steriliseret lidt Gelatine med indblandet Ølurt. Under Afkjølingen blev Kolben drejet saaledes, at denne Næringsgelatine, medens den stivnede, kom til at danne en Hinde paa en stor Del af den indvendige Væg, og Kolben sattes derpaa i Forbindelse med en anden Kolbe, hvori der fandtes en Renkultur af unge, kraftige Celler af Sacch. ellipsoideus I. Nogle af disse bleve derpaa tilligemed lidt steriliseret Vand førte over i Kolben med Gelatinehinden og ved Rystning udbredte i et tyndt Lag paa denne. Den største Del af det overførte Vand samlede sig paa Bunden af den sidst omtalte Kolbe og tjente her til at vedligeholde en passende Fugtighed. Selve Gjærcelle-Kulturen befandt sig ovenover Vandet. Af saadanne Kolber blev der præpareret et lille Antal, hvoraf nogle bleve satte ind i Thermostaten ved 25, andre ved 17° C. Efter kort Tids Forløb indeholdt de alle askosporeførende Celler, men uden at det var muligt at opdage en eneste Bakterie, ejheller da de i længere Tid havde været udsatte for den nævnte Temperatur; dog vare Livsbetingelserne gunstige herfor. Alle Arbejderne bleve naturligvis udførte saaledes, at fremmede Mikroorganismer holdtes borte. Et lignende Udfald fik et andet Forsøg, som blev anstillet med Sacch. Pastorianus I eller II. Mine Optegnelser give ikke nærmere Oplysninger om, hvilken

af de to Arter det var, der blev prøvet. Gjæren blev anbragt i en af de omtalte Kolber med steriliseret Gjærvand. Denne Vædske blev derpaa i nogen Tid stærkt luftet, men saaledes, at den bevaredes ren. Temmelig talrige Celler udviklede efterhaanden Askosporer; af Bakterier fandtes derimod intet Spor, Forsøget blev anstillet ved c. 24° C. Saavel Temperaturen som Næringsvædsken vare følgelig særdeles gunstige for en Udvikling af Bakterier, og disse vilde ogsaa have givet sig tilkjende, hvis de havde været tilstede. Alle ovenstaaende Forsøg vise saaledes tydeligt, at den franske Botanikers Opfattelse er urigtig.

Askosporerne have større Modstandskraft overfor Opvarmning i Vand end de unge, vegetative Celler. Dette fremgaar af følgende Forsøg.

Sacch. ellipsoideus II blev en Tidlang dyrket i Urt ved almindelig Stuevarme, og af den herved fremkaldte Avl udsaaedes derpaa unge, kraftige Celler i lignende Urt. Sidstnævnte Kultur blev henstillet 2 Døgn ved c. 27° C., og af den saaledes avlede Gjær blev en lille Portion overført i steriliseret destilleret Vand, hvis Temperatur var 54° C. Det viste sig da, at de efter at have tilbragt 5 Minutter neddykkede i Vandet og udsatte for den nævnte Temperatur endnu vare levende; en Opvarmning under lignende Forhold i 5 Minutter ved 56° C. taalte de derimod ikke.

Fuldmodne Askosporer, udviklede ved 17—18° C., som i Løbet af 8 Døgn vare blevne delvis indtørrede paa Gibsblokke ved den nævnte Temperatur, taalte derimod under de ovenfor beskrevne Forhold en Opvarmning i 5 Minutter ved 62, men derimod ikke 5 Minutter ved 66° C.

Lignende Forsøg bleve udførte med Sacch. cerevisiæ I; de viste, at de vegetative Celler, naar de vare dyrkede paa samme Maade som foregaaende Gjærarts, kun formaa at udholde en Opvarmning i 5 Minutter ved 52° C.; efter 5 Minutters Opvarmning ved 54° C. vare de derimod døde.

Bleve dens Askosporer behandlede som den foregaaende Arts, bevarede de deres Livskraft efter en Opvarmning i 5 Minutter ved 58° C., men ikke efter 5 Minutter ved 62° C.

Ovenstaaende Forsøg lære os ikke blot, at de fuldmodne Sporer taale en stærkere Opvarmning i Vand end de unge, vegetative Celler, men de give os tillige nye Beviser for, at der er Forskjel i den Maade, hvorpaa Arterne reagere overfor Temperaturerne.

Ligesom i Forsøgene over Udviklingen af Askosporerne gjælder det ogsaa her, at Tilstanden af de Celler, hvormed man opererer, faar en stor Indflydelse. I høj Grad bliver f. Ex. Resultatet bestemt deraf, om Experimentet udføres med gamle eller med unge Celler. Et slaaende Exempel herpaa havde jeg i Forsøgene med Sacch. ellipsoideus II. Til Sammenligning med de foran beskrevne, i hvilke der blev experimenteret med unge Celler fra en Kultur, der kun var 2 Døgn gammel, anstillede jeg et tilsvarende Forsøg med Celler fra en lignende, men $2^1/_2$ Maaned gammel Kultur. Disse gamle Celler taalte en Opvarmning i 5 Minutter ved 60^0 C., og det er ikke en Gang rimeligt, at Dødsgrændsen her var naaet. I Bundgjæren fandtes talrige Celler af den paa Øllets Overflade værende stærkt udviklede »levùre aérobie«. Om det var dennes eller selve Bundgjærens Celler, som havde udholdt den stærke Opvarmning, har jeg endnu ikke undersøgt. Disse Experimenter fortsættes imidlertid her paa Laboratoriet, og jeg vil forhaabentlig i sin Tid kunne give nøjere Oplysninger om dette og de andre herhenhørende Spørgsmaal.

Ogsaa paa Knopskydningen udøver Temperaturen en forskjellig Indflydelse overfor de forskjellige Arter. De Undersøgelser, jeg i den Retning hidtil har udført, have navnlig lært, at Arternes Maximumstemperaturer ikke ere de samme. Der vil følgelig ligeledes ad den Vej kunne findes Karakterer.

Til Slutning skal endnu omtales et interessant Exempel paa Temperaturens Indvirkning paa Cellerne af Sacch. cerevisiæ (Øl-Undergjærformen).

Om denne Gjærform meddeler Pasteur i »Etüdes sur la bière« p. 191, at den, naar den har tilbragt Maaneder i Saccharose eller i det Øl, som den ved sin Gjæring har frembragt, dog ikke som Sacch. Pastorianus faar Tilbøjelighed til at udvikle langstrakte Celler, naar den derpaa overføres i en god Næringsvædske, f. Ex. i luftet Urt, men derimod udvikler Celler med den normale Form. Dette er nu ikke ganske rigtigt. Forholdene ved disse Forsøg med udpint Gjær ere mere komplicerede, end Pasteur har tænkt sig. Det spiller navnlig en vigtig Rolle, om Dyrkningen i Urt foregaar ved en højere eller ved en lavere Temperatur. I nedenstaaende Forsøg vil jeg nærmere paavise dette:

Sacch. cerevisiæ (Øl-Undergjærform) blev i Løbet af et Aar dyrket i Saccharose med gjentagne Fornyelser af Vædsken i Forsøgets Begyndelse. Efter det nævnte Tidsrums Udløb blev en lille Portion af den saaledes udpinte Gjær overført i to Kolber med Urt, som derpaa bleve satte ind i Thermostaten, den ene ved 27,

den anden ved $7^1/_2{}^0$ C. I den førstnævnte af disse begyndte Gjæringen at vise sig efter næppe 2 Døgns Forløb. Ved den mikroskopiske Undersøgelse iagttoges det, at de nydannede Celler havde hovedsagelig den normale Form; de vare nemlig i Reglen ovale, sjeldnere kort pølsedannede, og optraadte enten enkeltvis eller i faacellede Kolonier. Kolben, som blev sat ind ved den lave Temperatur, viste først efter 14 Døgn svage Tegn til Gjæring. De nydannede Celler havde da et fra det Sædvanlige aldeles afvigende Udseende; deres Lysbrydning var nemlig svagere end ellers, og i Henseende til Formen var der foregaaet en meget paafaldende Omdannelse. Langstrakte Celler vare nemlig nu hyppige, og ikke sjelden dannede de sammenfiltrede Kolonier med mycelieagtige Forgreninger. De svarede, kort sagt, ikke længere til det Billede, man i Almindelighed danner sig af Sacch. cerevisiæ, men lignede derimod aldeles Pasteur's Afbildninger af Sacch. Pastorianus, f. Ex. Fig. 33, 34, 36 og 37, p. 171—175, i hans fornylig citerede Bog. Et lignende Forsøg anstillede jeg med Bundgjær, som havde staaet et Par Maaneder i Øl. Resultatet blev i alt Væsentligt det samme. I begge Tilfælde blev der naturligvis arbejdet med fuldstændig rene Kulturer. De gamle udpinte Gjærceller, som overførtes i Urt, udviklede altsaa ved $7^1/_2{}^0$ C. en Vegetation, hvis Celler havde et helt andet Udseende end de, der dannedes ved 27^0 C.

Tilbageblik.

I det første Afsnit af denne Afhandling have vi draget de sidste 15 Aars Literatur over vort Emne frem til kritisk Belysning. Vi stiftede her Bekjendtskab med nogle faa værdifulde Iagttagelser, men med flere grove Vildfarelser og Forsyndelser mod god Methode, med modstridende Anskuelser og med ubegrundede Paastande.

Om Engel's Meddelelse angaaende den ejendommelige Udvikling af Sporer hos Sacch. apiculatus erfarede vi, at den beror paa en Vildfarelse, og at hans nye Slægt, Carpozyma, følgelig ikke kan godkjendes.

Brefeld's Undersøgelser over Forholdene mellem Kulturgjær og vild Gjær, saa vi, ere forfejlede, og den Theori, som han byggede derpaa, altsaa uholdbar.

Paa samme Maade forholder det sig med van Tieghem's nye Tydning af Askosporerne som en pathologisk Dannelse, fremkaldt af Bakterier.

Ogsaa Wiesner's nye tekniske Methode viste sig at være urigtig.

Det sikre Resultat, som blev Udbyttet af de undersøgte Arbejder, skyldes navnlig Reess og indskrænker sig til den Oplysning, at Arter af Slægten Saccharomyces under visse, endnu overfladisk kjendte Vilkaar, kunne danne endogene Celler, og at disse i passende Næringsvædske udvikle sig til vegetative Celler med Knopskydning. Af Engel's Afhandling lærte vi en forbedret Methode til at foretage Askospore-Kulturer; den bestaar deri, at der anvendes fugtige Gibsblokke i Stedet for de af Reess anbetalede Skiver af Gulerødder, Kartofler o. s. v.

Ved at undersøge de Methoder, som Pasteur i sit berømte Værk om Øllet og dets Sygdomme har anvendt til Studiet af Saccharomyces-Arterne, kom vi til den Erkjendelse, at de ere utilstrækkelige, og at man ikke ad den af ham betraadte Vej kan komme ud over det Svævende og Usikre. Med Hensyn til det vigtige Spørgsmaal om Renkulturer saa vi, at medens han har ført Sagens ene Side frem til en høj Grad af Fuldkommenhed, har han derimod kun gjort lidet for den anden. Han har givet fortrinlige Anvisninger til under Experimenterne at bevare den tilstedeværende Kultur fri for fremmed Infektion, men de Methoder, han anvender for at erholde Renkulturer af Saccharomyces-Arterne, ere mangelfulde og kunne i de fleste Tilfælde slet ikke føre til Maalet. Heri fandt vi, at Aarsagen maa søges til den Uklarhed og til de Fejl, hvoraf hans Behandling af Alkoholgjærsvampene i nogle Retninger lider.

Vi erfarede, at hverken Gjærcellens Form, Størrelseforhold, Udseende eller Askosporer for sig ere tilstrækkelige til at give Arts-Karakterer, og at man, naar en passende Behandling anvendes, da af en af Arterne kan faa Former udviklede, som kunne henføres til alle de af Reess opførte askosporedannende Species. For Øjeblikket er det tilmed endnu et uafgjort Spørgsmaal, om de herhenhørende Former udgjøre et eller flere Species. Dette System gav os altsaa ejheller nogen sikker Vejledning.

Undersøgelserne maatte derfor optages fra nye Synspunkter, og Opgaven blive den: først at uddanne Methoden saaledes, at der kunde erholdes Vegetationer, der hver for sig stamme fra en eneste Celle, og dernæst at udfinde, om disse Renkulturer frembyde konstante Karakterer, og i saa Fald, hvilke disse ere.

Det er af sig selv indlysende, at man ved i tilstrækkelig Grad at fortynde en Vædske, hvori der findes Celler af en eller anden Mikroorganisme, tilsidst vil kunne naa et Punkt, hvor man

i et vist Maal af den fortyndede Blanding, ifald Cellerne ere jævnt fordelte deri, kun har en eneste Celle. Flere Forskere have i de sidste Aar med mere eller mindre Kritik benyttet denne Fremgangsmaade.

De fleste af de i ovenstaaende Experimenter anvendte Renkulturer bleve fremstillede derved, at en lille Portion Gjær anbragtes i en i Forvejen afvejet Vandmasse. Cellernes Antal blev derpaa bestemt ved Hjælp af Hæmatimetret, og derefter blev den i Vandet indblandede Gjær fortyndet saaledes, at der i den endelige Vandblanding kun fandtes et meget ringe Antal Celler, f. Ex. 0,5 i hver Kub-Cent. Ved at overføre 1 Kub-Cent. heraf i hver af et større Antal Kolber med Ølurt fik vi da en vis Sandsynlighed for, at nogle vilde blive inficerede med een Celle.

I andet Afsnit, hvor Methodens Rækkeevne blev undersøgt, fandt vi imidlertid, at det ikke altid gaar efter den mathematiske Beregning. Undertiden indeholdt f. Ex. Vandet, der blev benyttet til Infektionen, slet ingen og i andre Tilfælde flere Celler end oprindelig beregnet. Denne Ulempe undgaas, naar mit p. 52 beskrevne kvadrerede Dækglas benyttes.

Som foran berørt have vi kun en vis Sandsynlighed for, at nogle af vore inficerede Kolber have modtaget hver een Celle. Det gjaldt altsaa om at finde et Kjendetegn, ved Hjælp af hvilket det var muligt at udskille disse fra de øvrige. Denne vigtige Karakter fandtes i Følge den p. 55 meddelte Udvikling i de dannede Gjærpletters Antal.

En anden Kontrol blev udført paa den Maade, at to kjendte Gjærarter (Sacch. apiculatus og Sacch. cerevisiæ), som ved deres Form med Sikkerhed kunde skjelnes fra hinanden, bleve sammenblandede i vedkommende Kolbe med Vand. Efter Experimentets Udførelse vare de atter blevne adskilte og fandtes hver for sig i de Kolber med Næringsvædske, som bleve inficerede; et tydeligt Bevis paa Methodens Brugbarhed.

Ogsaa den, navnlig af Koch udviklede Methode til Fremstilling af Renkulturer af Mikroorganismer blev benyttet, dog med nogle Tillæmpninger. I en Gelatineopløsning med passende Næringsvædske bleve vedkommende Gjærceller ved Rystning saa vidt muligt jævnt fordelte, og det Hele derefter hældt ud paa en i Forvejen flammerenset Glasplade, der hurtigt anbragdes under en fugtig Glasklokke ved almindelig Stuevarme eller ved c. 25° C.

Ligesom de tidligere blev ogsaa denne Methode underkastet en experimentel Prøve ved Hjælp af den karakteristiske citronformede Gjærsvamp, Sacch. apiculatus. Vi erfarede heraf, at de

Gjærpletter, der udviklede sig, vel i Reglen hver indeholdt kun een Art, men at dette ingenlunde altid var Tilfældet. Spørgsmaalet blev da, hvorledes vi skulde kunne undgaa disse truende Undtagelser. Hertil aabner der sig navnlig to Veje: Man kan gjentage Forsøget med Celler fra en af de udviklede Vegetationspletter, og har man ikke i det første Forsøg været saa heldig at erholde en Udsæd af een Celle, er der Sandsynlighed for, at dette vil ske i de følgende. Med fuldstændig Sikkerhed vil man dog, som vi lærte, kun kunne naa Maalet, naar man foretager Dyrkningen i et fugtigt Kammer. I den Hensigt blev den flydende Gelatine med de deri indblandede Gjærceller anbragt paa et tyndt Dækglas i et tyndt Lag og derpaa blev dette fæstnet til Bøttcher's eller mit fugtige Kammer. Iblandt de indstøbte Celler opsøgtes nu en, hvis Beliggenhed var en saadan, at den havde Plads til at udvikle en særskilt Koloni uden Fare for at komme i Berøring med de andre, og Skridt for Skridt overbeviste vi os om, at den saaledes efterhaanden dannede Koloni virkelig stammede fra den ene oprindelig iagttagne Celle. Da Næringsbunden er fast, er denne Undersøgelse langtfra saa vanskelig, som hvis vi havde benyttet en Vædske.

Ved Undersøgelser, der, som de foreliggende, strække sig gjennem flere Aar, har det sin Betydning at udfinde bekvemme Opbevaringsmidler, ved Hjælp af hvilke Gjærcellerne kunne holdes levende i lang Tid og fri for Infektion. Dette, lærte vi, blev opnaaet ved Hjælp af den p. 63 beskrevne Vædske og ved Hjælp af Indtørring paa Filtrerpapir, p. 63.

Hovedindholdet af nærværende Afhandling udgjøres af en Række Undersøgelser over Askosporedannelsen. Til de herhenhørende Dyrkningsforsøg bleve Engel's Gibsblokke i Reglen anvendte. At Objektglas med Gelatinehinder yde et bekvemt Middel til at foretage disse Kulturer, naar den Temperatur, man anvender, ikke er for høj, have vi set; og ligeledes, at man i Gjærvand, som luftes, kan fremkalde den nævnte Udvikling.

Afbildningerne paa medfølgende Kobbertavle vise os Exempler paa de ejendommelige Udviklingsformer, som i Afhandlingen blive kaldte Skillevægdannelser. Der er ligeledes fremstillet Celler, hver indeholdende et større Antal Askosporer end det normale, nemlig 5—10. Det erindres, at navnlig Arterne af Gruppen Pastorianus viste Tilbøjelighed til i den Retning at gaa udenfor Reglen. Forøvrigt lærte vi atter, at de samme Grupperinger og Størrelseforhold kunne optræde hos alle de undersøgte Arter, og at man ikke ad den Vej kan erholde Arts-Karakterer.

Spørgsmaalet blev da stillet paa en anden Maade, idet Udviklingsgangen under Indflydelsen af forskjellige Temperaturer blev undersøgt. Herved erholdt vi værdifulde Oplysninger.

Vi erfarede, at ingen af de sex Arter under de angivne Dyrkningsforhold udviklede Askosporer ved en lavere Temperatur end en Varmegrad mellem $^{1}/_{2}$ og 3^{0} C., og at den højeste Temperatur, ved hvilken de endnu dannedes, ligger i Nærheden af $37^{1}/_{2}{}^{0}$ C. Temperaturkurverne for denne Udvikling have i alle sex Tilfælde hovedsagelig samme Form. De danne krumme Linier, som fra de laveste Varmegraders Ordinater stige ned mod Abscisseaxen og derefter atter fjerne sig lidt fra denne. Kardinalpunkterne, navnlig de af Maximums- og Minimumstemperaturerne bestemte, give derimod karakteristiske Skjelnemærker mellem Arterne.

Det er sandsynligt, at en saadan komparativ Undersøgelse, udført fra et lignende Synspunkt, ogsaa vil kunne bringe Opklaring paa Bakteriernes Omraade. Min første Meddelelse fra 1882 har allerede henledet nogle Forskeres Opmærksomhed i den Retning, men endnu er ingen bestemt Undersøgelse fremkommen. Maaske vil der her træde større Vanskeligheder frem end dem, hvormed ovenstaaende Experimenter maatte kæmpe.

Ved at betragte den Tid, som de sex Arter ved en og samme Temperatur kræve til Udviklingen af Askosporer, fandt vi, at der ligeledes her kan vise sig Differenser; dette saas f. Ex. af den Sammenligning, vi foretoge ved $11^{1}/_{2}{}^{0}$ C.

Det blev fremhævet, at det ved saadanne Undersøgelser ikke er tilstrækkeligt blot at bestemme de ydre Forhold, hvorunder Dyrkningsforsøgene blive udførte, men at vi tillige maa sørge for, at Cellerne af de Arter, hvormed vi experimentere, ere avlede under samme Vilkaar. Vi maa overhovedet vel erindre, at Organismen betyder en Uendelighed af forskjellige Tilstande, hvilke hver for sig kunne faa Indflydelse paa Udfaldet af vore Experimenter. Idetmindste i Hovedtrækkene maa vi udklare Grændserne for os.

Ogsaa i andre Retninger saa vi, at der er Forskjel i den Maade, hvorpaa Arterne reagere overfor Temperaturen.

Sacch. ellipsoideus II taalte saaledes en stærkere Opvarmning i Vand end Sacch. cerevisiæ I, dette gjaldt saavel, naar Sammenligningen foretoges med de to Arters Sporer, som naar den foretoges med deres unge, vegetative Celler. Samme Arts fuldt modne Askosporer taalte en stærkere Opvarmning end de helt unge, vegetative Celler.

Med Hensyn til Knopskydningen lærte vi ligeledes, at Temperaturen udøver en forskjellig Indflydelse overfor de forskjellige Arter.

De sidst omhandlede Experimenter viste os endelig et interessant Exempel paa, hvorledes Temperaturen i visse Tilfælde formaar at bestemme Cellens Form.

Experimenterne have saaledes udvidet sig til sideliggende Spørgsmaal, og Afhandlingens Indhold er herved egentlig blevet et Bidrag til en almindelig Undersøgelse over den Indflydelse, som Temperaturen udøver paa Saccharomyces-Arterne, naar disse befinde sig under forskjellige Livsforhold, bestandig dog med særligt Hensyn til det fra Begyndelsen stillede Hovedspørgsmaal om Arterne og disses Begrændsning.

Forklaring over Tavlerne.

De to Tavler med Kurverne.

Temperaturen er afsat paa Abscisseaxen, og de Tidsrum, der ved de paagjældende Varmegrader kræves til Udviklingen af Askosporerne, som Ordinater.

Tab. I.

Saccharomyces cerevisiæ I. p. 68 og 73—74.
Saccharomyces Pastorianus I. p. 69 og 73—75.
Saccharomyces Pastorianus II. p. 70 og 74.

Tab. II.

Saccharomyces Pastorianus III. p. 70 og 74.
Saccharomyces ellipsoideus I. p. 71 og 74.
Saccharomyces ellipsoideus II. p. 71 og 74.

Kobbertavlen.

Alle Figurerne ere forstørrede c. 1000 Gange, lineær. **a** betegner Celler med Skillevægdannelserne, **b** Celler, hvori der findes et større Antal Askosporer end det normale, **c** Celler med tydelige Anlæg til Askosporer; det er dette Udviklingstrin, der er blevet benyttet til Bestemmelsen af den Tid, der ved forskjellige Temperaturer kræves til Dannelsen af disse Formeringslegemer.

Fig. 1. Saccharomyces cerevisiæ I. p. 67.
- 2. Saccharomyces Pastorianus I. p. 68.
- 3. Saccharomyces Pastorianus II. p. 69.
- 4. Saccharomyces Pastorianus III. p. 70.
- 5. Saccharomyces ellipsoideus I. p. 71.
- 6. Saccharomyces ellipsoideus II. p. 71.

III.

Om Pasteur's Torula.

Naar man i længere Tid foretager omfattende Undersøgelser over Saccharomyces-Arterne, vil man ikke kunne undgaa ofte at træffe paa de gjærsvampelignende Celler, Pasteur i sin Bog om Øllet og dets Sygdomme har kaldt Torula; de ere meget udbredte og tilhøre, som det vil ses af det Følgende, flere Arter. For at erholde Overblik og Sikkerhed paa dette Omraade bliver man nødsaget til, idetmindste til en vis Grad, ogsaa at underkaste disse Celler et nøjere Studium. I nærværende Tidsskrifts I B. 4 Hefte gav jeg nogle faa Meddelelser derom; jeg har imidlertid senere forøget mine Iagttagelser i den Retning og føjet nye Bidrag til det, Pasteur har meddelt. Da jeg ikke i en overskuelig Fremtid vil komme tilbage til disse Undersøgelser, agter jeg nu at give en samlet Fremstilling af, hvad vi i Øjeblikket vide om disse Former.

Paa Tavle III i det citerede Værk har Pasteur afbildet to Former af sin Torula, en større og en mindre, men begge kuglerunde, og i hans Fig. 12, p. 75, gjenfinde vi dels de samme, dels Kolonier af langstrakte og kort pølsedannede Celler i Knopskydning. Alle disse Figurer have stor Lighed med Saccharomyces-Arter, og de langstrakte Celler kunne tillige efter Formen henføres til Dematium eller lignende Skimmelsvampe. Om her foreligger forskjellige Arter eller ej, afgjøres ikke, men det antydes, at alle disse i saa høj Grad forskjellige Skikkelser godt kunne tænkes at høre genetisk sammen, og han kommer atter paa dette Punkt tilbage til sin Yndlingstanke, at man, hvis man var saa heldig at faa nogle Kolber med Næringsvædske inficerede hver med en eneste af disse Celler, da ogsaa, selv om de alle hørte til een Art, vilde

erholde ligesaa mange forskjellige Varieteter, som man havde Vegetationer, der hver stammede fra een Celle. At de ikke høre til Saccharomyces-Arterne, slutter han deraf, at de kun danne yderst ringe Mængder Alkohol, endog efterat de have tilbragt meget lang Tid i en gjæringsdygtig Næringsvædske. Kulsyreudvikling med Skumdannelse iagttog han ejheller i noget Tilfælde. Han er tilbøjelig til at antage, at de høre genetisk sammen med Sacch. Mycoderma (Mycoderma vini), og ved at foretage Analyser af Luftens Støv paa forskjellige Steder fik han det Indtryk, at de navnlig vare talrige i hans Laboratorium.

Af saadanne smaa runde, gjærsvampelignende Celler som dem, Pasteur afbilder paa sin Tavle III, har jeg iagttaget 5 forskjellige Arter.

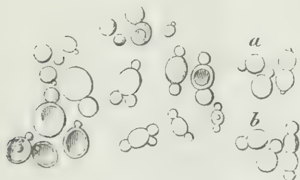


Fig. 1.

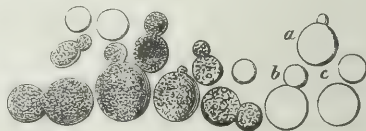


Fig. 2.

Fig. 1 forestiller en af dem. Dyrkes disse Celler i Ølurt, saa finder man dem her enten enkeltvis eller i faacellede Kolonier. I sidste Tilfælde danne de ofte Kjæder paa 3—4 Celler. Naar der optræder Vakuoler, findes der i Reglen een stor i Cellens Midte, og heri iagttages undertiden et stærkt lysbrydende lille Korn. Cellerne maalte $1^1/_2 - 4^1/_2$ Mikromillim.

Fig. 1 a viser nogle Celler i begyndende Knopskydning, og i b ses de samme Celler efter næppe 1 Times Forløb. De bleve dyrkede i Ølurt i Ranvier's Kammer ved almindelig Stuevarme. I Urt og i Sukkeropløsninger frembragde de først efter lang Tids Henstand en næppe kjendelig Alkoholmængde uden Spor af Skumdannelse; Invertin udsondrede de ikke.

I ovenstaaende Fig. 2 er der fremstillet en Art, hvis Celler, naar de dyrkes under samme Forhold som den foregaaende Arts, da ere større end dennes; de vare nemlig 3—8 Mikromillim. I Urt-Kulturer blev deres Protoplasma ofte grynet og kom til at indeholde stærkt lysbrydende smaa Korn. Forøvrigt forholdt de sig væsentlig som foregaaende.

Fig. 2 a forestiller en Celle, som har udskudt en lille Knop; i b ses samme Celle efter $1^1/_2$ og i c efter $3^1/_2$ Times Forløb.

Forsøget blev anstillet i Ranvier's Kammer paa samme Maade som hos den foregaaende.

En tredie Art, som i Udseende og Størrelseforhold meget nøje ligner den i Fig. 2 afbildede, gav derimod i lignende Kulturer i Urt (14 % Ball.) indtil 7/8 Vol. % Alkohol; paa den gjærende Vædskes Overflade optraadte der i dette Tilfælde en ringe, men tydelig Skumdannelse, og Analyserne paaviste med Sikkerhed, at der havde fundet en Udvikling af Kulsyre Sted. Endnu efter 16 Døgns Henstand ved almindelig Stuevarme i en Saccharose-Opløsning havde den ikke inverteret denne.

Den i hosstaaende Fig. 3 aftegnede Form stod i Henseende til Størrelsen midt imellem de foran beskrevne; dens Celler maalte nemlig 2–6 Mikromillim. I fysiologisk Henseende adskilte den sig væsentlig fra de tre foregaaende, idet den nemlig inverterede Saccharose, og i Urt (14 % Ball.) og Sukkeropløsninger frembragde en ret kraftig Alkoholgjæring (lidt over 1 Vol. %) med stærk Skumdannelse.



Fig. 3.

De beskrevne 4 Arter stemme overens deri, at de ved at dyrkes paa fugtige Gibsblokke, Kartoffelskiver og Gelatinehinder med forskjellige Næringsvædsker hverken udviklede Askosporer eller Mycelium, men ligesom i de sukkerholdige Næringsvædsker kun formerede sig ved Knopskydning.

I ingen af de til Dyrkningen benyttede Vædsker (Urt, Øl, Gjærvand, Dextrose- og Saccharose-Opløsninger) dannede de Hinder som Sacch. Mycoderma.

Efter flere Maaneders Henstand af Urt-Kulturerne fremkom der her lignende Hindedannelser som de, der ogsaa hos Saccharomyces-Arterne ere almindelige (Pasteur's »levûre aérobie«). Disse ere imidlertid af en hel anden Natur end Mycoderma-Hinderne og maa ikke forvexles hermed. I »levûre aérobie«-Dannelserne vare Cellerne af den tredie af de beskrevne Arter ofte langstrakte; de øvrige Arters havde derimod det sædvanlige Udseende.

Naar de foran beskrevne Arter efter i lang Tid at have været udpinte i Saccharose, bleve overførte i Urt, formerede de sig her paa sædvanlig Vis ved Knopskydning, og de nydannede Celler vare kuglerunde ligesom tidligere, uden at vise nogen Tilbøjelighed til i Lighed med, hvad der er almindeligt hos visse Saccharomyces-Arter, at antage en langstrakt Form.

At der ogsaa iblandt disse saakaldte Torula findes virkelig hindedannende Former, der altsaa i den Retning have Lighed med

Sacch. Mycoderma, har jeg i Løbet af det sidste Aar ofte havt Lejlighed til at iagttage. En af disse, som blev særlig undersøgt, lignede nærmest Fig. 1. Den udviklede ved almindelig Stuevarme hurtig en jævn, mat, graaladen Hinde over hele Vædskens Overflade, naar den var udsaat i Urt, Gjærvand, Lagerøl eller endog i stærkt alkoholrige Næringsvædsker (10 Vol. %). Paa Saccharose-Opløsninger dannede den kun en svagt udviklet Hinde, og den inverterede denne Vædske.

Efter i flere Maaneder at have været dyrket i Saccharose, blev den overført i Urt, hvor den ogsaa dannede kraftige Vegetationer, men kun kuglerunde Celler. Kjendelig Gjæring fremkaldte den ikke, og man havde Vanskelighed ved, endog naar den i meget lang Tid havde været dyrket i Urt, at paavise svage Spor af Alkohol deri.

I Kulturer paa Gibsblokke, Kartoffelskiver og Næringsgelatine dannede den hverken Askosporer eller Mycelium. Den bevarede, kort sagt, under alle Dyrkningsforhold sin kuglerunde Form.

Det følger af sig selv, at de ovenomtalte Forsøg bleve foretagne med Renkulturer, og at de benyttede Vædsker vare steriliserede. Figurerne vise i alle Tilfælde de paagjældende Celler i en Forstørrelse af 1000 Gange lineær.

Uagtet de fysiologiske Differenser, som de fem Arter frembyde, er det dog ikke muligt ved mikroskopisk Undersøgelse alene at skjelne imellem dem. Saavel ved paafaldende som gjennemfaldende Lys vise de sig at være farveløse, og overfor mikrokemiske Reagenser forholde de sig ens og paa samme Maade som de Saccharomyces-Arter, der i den Retning hidtil ere blevne undersøgte.

Som foran berørt, ere disse Torula-Celler, som Pasteur har kaldt dem, meget udbredte. I de Undersøgelser, som jeg i Aarene 1878—1881 foretog over Luftens Mikroorganismer i og omkring Carlsberg, iagttoges de jævnlig saavel inde i Lokalerne som i det Frie. Hyppig har jeg fundet dem i Blomster og paa andre Plantedele, saaledes ogsaa paa modne Druer i Vogeserne under Vinhøsten i 1881, samt saavel i Have- som i Markjord. Meget almindelig fandtes de i Haarklædningen af overvintrede Bier og Humler og ligeledes i disse Insekters Boliger.

Paa Grund af deres store udvortes Lighed med runde Celler af Saccharomyces-Arterne kunne de let forvexles med disse. Saadanne Fejltagelser ere ogsaa ofte begaaede. Vildledende ere navnlig de Former, der, som den fjerde i min ovenfor meddelte Beskrivelse, have en temmelig udviklet Fermentvirksomhed.

Det eneste Skjelnemærke, som vi her i Øjeblikket kunne opstille, er Askosporedannelsen. Denne findes ikke hos vore Torula-Celler, og vi henregne dem derfor ikke til Slægten Saccharomyces. De af Pasteur undersøgte Torula fremkaldte, som det erindres, enten slet ingen eller i det Højeste en yderst ringe Alkoholgjæring, og paa Grund heraf sluttede han, at de ikke kunne henføres til den nævnte Slægt. I det Foregaaende saa vi imidlertid, at der af hans Torula findes en Række Former med mere og mindre udviklet Fermentvirksomhed, og at der herved dannes en hel Skala fra det Punkt, hvor det ikke er muligt med Sikkerhed at iagttage nogen Alkoholgjæring, og til det, hvor denne ret kraftig træder frem. Ad den Vej kunne vi følgelig ikke finde nogen Grændse. Idet Askosporedannelsen drages frem som adskillende Karakter, maa det ikke glemmes, at iblandt de Arter, som i Almindelighed henføres til den nævnte Slægt, findes en, nemlig Sacch. Mycoderma, om hvilken det er tvivlsomt, om den kan udvikle Askosporer eller ej, og en anden, nemlig Sacch. apiculatus, om hvilken det nu vides, at den idetmindste ikke udvikler disse Formeringsorganer under de Forhold, hvor de hidtil undersøgte Arter danne dem. I Øjeblikket vilde det imidlertid være overilet at omforme Systemet og indføre nye Navne; dette maa vente, til alle de nødvendige Undersøgelser ere blevne gjennemførte.

Mærkeligt er det, at Pasteur selv ingen Forsøg har anstillet over Askosporedannelsen. Følgen heraf er bleven den, at hans Disciple ej heller have havt deres Opmærksomhed henvendt i den Retning.

I de talrige Dyrkningsforsøg, som jeg paa forskjellig Maade anstillede med de beskrevne fem Arter, viste der sig intet Tegn til, at de, som Pasteur er tilbøjelig til at tro, skulde være Former af Sacch. Mycoderma. Det er vel ogsaa mere sandsynligt, at de ere Udviklingstrin af højere staaende Svampe. Der kjendes jo nu mange Exempler paa, at saadanne kunne udvikle gjærsvampelignende Celler, navnlig har f. Ex. De Bary paavist dette hos Dematium pullulans og Exoascus Pruni og Zopf hos Fumago. Udelukket er naturligvis ejheller den Mulighed, at de kunne være selvstændige Arter, som ikke optræde med andre Former end de af Pasteur og mig beskrevne.

Iblandt Pasteur's Afbildninger i hans Fig. 12 findes der nogle, som dels minde om Sacch. Mycoderma og dels om hans »Dematium-levûre«. Usandsynligt er det ikke, at vi her have de samme Former for os, hvorom jeg i dette Tidsskrifts 1 B. 4 Hefte, p. 409, gav nogle Meddelelser. Det er mere eller mindre langstrakte,

grenede, farveløse Celler, og de have Lighed med visse Udviklingstrin af Dematium pullulans. De af mig i sin Tid undersøgte gave enten slet ingen eller meget svag Alkoholgjæring; Saccharose-Opløsning inverterede de derimod hurtigt.

Slægtsnavnet, Torula, blev først indført i Systemet af Persoon 1796 i hans Observationes mycologicæ. Oprindelig betegnede Navnet Hyfomyceter med rosenkrandsformede, enkelte eller grenede Kjæder, hvis runde eller ovale Led kunne skilles ad hver for sig. Corda og andre af den Tids Mykologer have afbildet ret talrige Arter. Af Beskrivelserne og de kolorerede Figurer ses, at de kunne optræde med forskjellige Farver: graa, brune, sorte, røde, gule eller grønne. Efterhaanden blev Slægtsnavnet et Pulterkammer for en Mængde indbyrdes meget forskjellige Skikkelser, og den gamle Betydning, der laa i Ordet, blev ikke længere strængt respekteret. Saaledes kom Navnet ogsaa til at betegne Øl-Gjærsvampen. I Turpin's berømte Afhandling om Alkohol- og Eddikesyregjæringen fra 1838 kaldes denne nemlig Torula cerevisiæ. Senere har Cohn indført det i sin systematiske Beskrivelse af Bakterier, nemlig om de rosenkrandsformede Kjæder, som Mikrokokker kunne danne.

Navnet Torula har altsaa den uheldige Egenskab, at der ikke længere er knyttet en bestemt Betydning dertil.

Hovedresultatet af disse Undersøgelser bliver, at der i Naturen findes almindelig udbredt flere Arter af gjærsvampelignende Celler, hvis fysiologiske Forhold vi i nogle Retninger kjende, men om hvis systematiske Stilling vi endnu kun vide meget lidet. I Sammenligning med de kraftigst virkende Saccharomyces-Arter fremkalde de kun en svag Alkoholgjæring (Undergjæring), og nogle besidde vistnok slet ikke denne Evne. Nogle invertere Saccharose-Opløsninger, andre mangle derimod denne Fermentvirksomhed. Idetmindste en af de hidtil undersøgte Arter dannede hurtigt Hinder paa Overfladen af de Næringsvædsker, hvori den blev udsaat, ligemeget enten disse indeholdt Alkohol eller ej; de andre formaaede derimod ikke dette.

IV.

Sygdomme i Øl, fremkaldte af Alkoholgjærsvampe.

———

Det er strængt taget ikke korrekt at kalde de uheldige Forandringer, som Øllet kan undergaa, Sygdomme, thi dette Ord betyder en vis Tilstand hos en levende Organisme og kan derfor egentlig ikke anvendes om døde Gjenstande. Sproget tillader sig imidlertid, som bekjendt, mange Friheder, og er det oprindeligt Lovløse blevet gjentaget tilstrækkeligt længe af Forfattere med et berømt Navn, saa faar det tilsidst Hævd. Paa denne Maade er det ogsaa gaaet i det foreliggende Tilfælde. Pasteur har i sine gjæringsfysiologiske Arbejder almindeligt benyttet Ordet i den angivne Betydning, og i ansete Værker over Ølfabrikationen, f. Ex. i Lintner's og Thausing's, tales der ligeledes om Sygdomme i Øl og om Sygdomsfermenter. Det vilde sikkert ogsaa være vanskeligt at finde et bedre Ord, og nu, da dets nye Betydning kan siges at være slaaet fast, kunde en Forandring næppe anses for heldig. Ligesom i mine tidligere Skrifter vil jeg derfor fremdeles benytte det i den angivne Betydning.

Iblandt de Sygdomme, som Alkoholgjærsvampene kunne fremkalde i Øl, er der en, der i de sidste Aar har tildraget sig stor Opmærksomhed saavel herhjemme som navnlig i Tydskland. Den har foraarsaget mange Bryggerier store Tab og staar endnu trods Alt, hvad der er skrevet derom, som en faretruende Gaade. Jeg tænker paa den Sygdom, der bestaar deri, at undergjæret Øl bliver gjærtykt. Strax efter Lagringens Slutning, naar det tappes af Fadene i de kolde Kjældere, er det klart, og med blotte Ojne er

det ikke muligt at opdage Gjær deri, men har det i Foustager eller i Flasker, hvori det blev aftappet, været nogle faa Dage udsat for en noget højere Temperatur end den, der fandtes i vedkommende Lagerkjælder, f. Ex. blot for almindelig Stuevarme, saa danner der sig et mere eller mindre rigeligt Gjærbundfald, som ved en endog temmelig ringe Bevægelse i Vædsken mudres op og gjør denne plumret. Der er flere Grader i denne Sygdom; er den stærkt udviklet, bliver Øllet, som er angrebet deraf, allerede 1—2 Døgn efter Aftapningen stærkt gjærtykt, saa at det ikke kan drikkes; findes Sygdommen i en mildere Grad, kan det holde sig flere Dage, navnlig hvis Temperaturen ikke er for høj; saadant Øl vil i Henseende til Holdbarhed dog bestandig staa tilbage for det, der er sundt.

Der er, som antydet, skrevet en hel Del om dette for Gjæringsindustrien saa vigtige Spørgsmaal. I alle Lærebøger fra den nyere Tid om Ølbrygning er det blevet behandlet, og det er ligeledes ofte blevet drøftet i Afhandlinger i forskjellige Bryggeri-Tidsskrifter. Iagttagelser fra den praktiske Drift ere her blevne sammenstillede, og Formodninger om Aarsagen til Ondet udtalte. Nogle Forfattere mene, at det er en fremmed Gjærsvamp, Sacch. exiguus, som fremkalder Sygdommen, andre antage derimod, at den har sin Grund deri, at den almindelige Bryggerigjær selv, Sacch. cerevisiæ, er degenereret, saa at den i Stedet for at udvikle store, vægtfyldige Celler udvikler smaa, lette.

Der findes i den berørte Literatur, der jo, som omtalt, er Udtryk for de forskjellige Opfattelser, tænksomme Praktikere have dannet sig af Fænomenet, gode Vink, som give Anledning til Overvejelse. Det er imidlertid indlysende, at en Løsning af Spørgsmaalet ikke kan erholdes gjennem en Diskussion paa Grundlag af spredte Iagttagelser, men kun gjennem en planmæssig gjennemført, experimentel Undersøgelse. En saadan forelægges her for første Gang Offentligheden.

For nogle faa Aar siden havde et af de større kjøbenhavnske Bryggerier det Uheld, at den omtalte Sygdom sneg sig ind i dets Drift. I temmelig lang Tid huserede den her og fremkaldte en ikke ringe Skade. Først da Bryggeriet havde standset en Tid og faaet saavel Lokalerne som Karrene og alle Redskaberne grundigt rensede, malede og ferniserede, var Ondet bekæmpet, og da Driften igjen optoges med god Gjær fra et andet Etablissement, blev dets Øl atter ligesom tidligere holdbart. Da jeg besluttede at forsøge paa om muligt at opklare denne dunkle

Sag, henvendte jeg mig, medens Sygdommen endnu var paa sit Højeste, til Bestyreren af det hjemsøgte Bryggeri med Anmodning om af og til at erholde Prøver af Øllet paa dets forskjellige Stadier. Disse saavelsom de Oplysninger, jeg ønskede, bleve mig tilstillede med stor Beredvillighed, og udtaler jeg herved min Tak derfor.

Ved Hjælp af de i en af mine foregaaende Afhandlinger meddelte Methoder p. 51, isolerede jeg de Arter af Mikroorganismer, der fandtes i det syge Øl. Af Alkoholgjærsvampe erholdt jeg paa denne Maade tre Arter, nemlig Sacch. cerevisiæ (en Undergjærform, Hovedbestanddelen af Bryggeriets Gjær), Sacch. Pastorianus III (en Overgjærform, se p. 70) og Sacch. ellipsoideus II (en Undergjærform, se p. 71).

Mit Forsøg gik derefter ud paa at afgjøre, om Sygdommen skyldtes nogen af de to sidste Gjærarter. I den Hensigt blev der først anstillet en Række Experimenter med 6 Pasteurske Kolber; hvoraf hver indeholdt 700 Kub.-Cent. af samme steriliserede Urt. Til to af Kolberne, der vare mærkede A, blev derpaa til hver sat $1^1/_4$ Kub.-Cent. af den omtalte Sacch. cerevisiæ, til hver af to, mærkede B, 1 Kub.-Cent. af samme Gjær og desuden $^1/_4$ Kub.-Cent. af Sacch. ellipsoideus II, til hver af to, mærkede C, 1 Kub.-Cent. ligeledes af samme Sacch. cerevisiæ og $^1/_4$ Kub.-Cent. af Sacch. Pastorianus III. Den anvendte Gjær var i alle Tilfælde temmelig tykflydende og i den Henseende nogenlunde ens, den var avlet i Renkulturer under samme Forhold og bestod af unge, kraftige Celler.

Hovedgjæringen foregik ved almindelig Stuevarme; i C optraadte svage Overgjæringsfænomener, i A og i B Undergjæring. Eftergjæringen under Lagringen fandt derimod Sted ved c. 7° C. Til Lagringen blev der benyttet Pasteurske Kolber; disse bleve stærkt fyldte med vedkommende Øl. Efterat Øllet havde været lagret c. 3 Maaneder blev det aftappet paa steriliserede, tohalsede Kolber, som derpaa bleve henstillede i et Skab ved almindelig Stuevarme. Det viste sig da, at Øllet fra B og C blev aldeles gjærtykt efter mindre end 8 Døgns Henstand, medens A endnu efter 14 Døgns Forløb intet fejlede i den Retning. Heraf fremgik altsaa, at den ene af de tre Gjærarter i det syge Øl, nemlig Sacch. cerevisiæ, gav et holdbart Produkt, naar den var ene tilstede i den gjærende Vædske, men at Sygdommen derimod indtraadte, saasnart en af de to andre Arter, ligemeget hvilken, blev blandet sammen med den i det nævnte Forhold. Dette er tillige et Exempel paa, hvilke

Resultater, der kan opnaas, naar de foran beskrevne Methoder anvendes.

Da Gjæringen foregaar meget langsomt i de Pasteurske Kolber, blev Forsøget gjentaget ved Hjælp af Cylinderglas, der bleve overbundne med flammerenset Filtrerpapir. Herved fik Forholdene ogsaa større Lighed med dem, der findes i Bryggerierne. Der blev anvendt 6 Glas i alt, og ligesom tidligere vare de to mærkede A, de to B og de sidste to C. Hvert indeholdt 1300 Kub.-Cent. af samme steriliserede Urt. Til hvert af Glassene, mærkede A, blev der sat 2½ Kub.-Cent. af den nævnte Sacch. cerevisiæ; af samme Gjær blev der sat 2 Kub.-Cent. til hvert af Glassene, mærkede B og C, og desuden til B ½ Kub.-Cent. Gjær af Sacch. ellipsoideus II og til C ½ Kub.-Cent. Gjær af Sacch. Pastorianus III.

Saavel i dette som overhovedet i alle de Forsøg, der udførtes, blev der sørget for, at A, B og C kom til at stemme nøjagtigt overens i alle Forhold, med Undtagelse af den forskjellige Gjærtilsætning, om hvis Indvirkning Spørgsmaalet jo drejede sig. Hovedgjæringen varede 9 Døgn; Temperaturen i Værelset var 14—15° C.; C viste svage Overgjæringsfænomener, de andre Undergjæring. Øllet blev derpaa heldt over paa Flasker, der vare lukkede med Kautschukpropper, i hvilke der fandtes et langs Flaskens Ydervæg nedadbøjet Glasrør. Hensigten med dette var at give den under Eftergjæringen dannede Kulsyre en Vej, ad hvilken den kunde slippe ud, uden at man samtidig udsatte Vædsken for at blive angreben af Mikroorganismer udenfra. Lagringen fandt Sted i 2 Maaneder ved 6—7° C. Efter den Tids Forløb blev Vædsken aftappet paa almindelige Ølflasker af farveløst Glas. De vare i Forvejen steriliserede.

Øllet var i alle Tilfælde klart, og det var ikke muligt med det blotte Øje at iagttage Gjær deri; men allerede efter et Døgns Henstand ved almindelig Stuevarme viste Øllet af B og C en begyndende Gjærtykhed. Denne tiltog Dag for Dag, og efter 12 Døgns Forløb vare alle Flaskerne med Øllet fra B og C aldeles plumrede. Endnu efter 15 Døgns Henstand var Øllet fra A derimod klart, uden nogen Gjærtykhed.

Lignende Resultater erholdt jeg, da jeg gjentog Forsøgene med den Forandring, at jeg i Stedet for den omtalte Sacch. cerevisiæ, som jeg havde udskilt af det syge Øl, anvendte en Renkultur af Sacch. cerevisiæ, Undergjærform fra Gl. Carlsberg Bryggeri.

Efterat Experimenterne saaledes havde vist, at Sygdommen optræder, naar der ved Hovedgjæringens Begyndelse findes en vis Gjærmængde af en af de to Arter i Paasætningsgjæren, blev det

næste Spørgsmaal stillet, nemlig hvorledes de samme Sygdomsfermenter vilde forholde sig, naar de først bleve indførte i Øllet efter Hovedgjæringens Slutning, altsaa paa det Stadium, da Lagringen begynder.

I den Hensigt blev der ved Hjælp af de Pasteurske Kolber udført nogle lignende Forsøg som de foran beskrevne. I den ene Række blev Infektionen med de to vilde Gjærarter foretaget ved Hovedgjæringens Begyndelse, og i den tilsvarende anden Række først ved Hovedgjæringens Slutning. Efter Lagringen var Øllet i begge Rækkerne uden noget Spor af Gjærtykhed. I den første Række traadte den derimod frem hos det med Sygdomsorganismerne inficerede Øl, da det havde staaet aftappet nogle faa Dage i Værelset; men det Øl, hvori kun fandtes Sacch. cerevisiæ, blev ligesom tidligere ikke angrebet af Sygdommen, og dette gjaldt ogsaa om alt Øllet fra anden Forsøgsrække.

Disse Forsøg gave os altsaa den interessante Oplysning, at *de to Sygdomsfermenter ikke kunne fremkalde Sygdommen, naar de først tilsættes Øllet efter Hovedgjæringens Slutning.*

Man kunde maaske heraf fristes til at tro, at det altsaa egentlig er overflødigt at anvende saa Meget paa Lagerfadenes Rensning og Begning som hidtil. Jeg maa da erindre om, at ovenstaaende Resultat kun gjælder for de to Gjærarter, hvormed der blev experimenteret. Foruden disse kan der imidlertid, som mine tidligere Undersøgelser have vist, i Lagerfadene optræde forskjellige andre Mikroorganismer, der ere i Stand til at fremkalde ligesaa alvorlige Sygdomme i Øllet som den beskrevne.

For at prøve ovenstaaende Resultat umiddelbart i den praktiske Drift, gjentog jeg det netop beskrevne Forsøg saavel med Lagerøl som med Exportøl fra Bryggeriet Gl. Carlsberg's Gjæringskjælder paa det Stadium, da dets Hovedgjæring var afsluttet, og det altsaa skulde føres i Lagerkjælderen. Af hver Ølsort blev der fyldt 3 Foustager, A, B, C, hver paa $16^{1}/_{2}$ Liter; B blev derpaa inficeret med 10 Kub.-Cent. temmelig tykflydende Gjær af Sacch. ellipsoideus II og C med 10 Kub.-Cent. ligeledes temmelig tykflydende Gjær, men af Sacch. Pastorianus III; de med A mærkede Foustager bleve derimod ikke inficerede. Gjæren af Sacch. ellipsoideus II og Sacch. Pastorianus III var avlet i Kulturer med Urt ved samme Temperatur som de i Øllet værende Celler af Sacch. cerevisiæ. Da Forsøget saaledes var sat i Gang, bleve alle 6 Foustager lagte ned i Bryggeriets Lagerkjælder og her lagrede paa sædvanlig Vis i henved $2^{1}/_{2}$ Maaned, altsaa en

forholdsvis meget kort Lagringstid for Exportøllets Vedkommende. Temperaturen i Lagerkjælderen var c. 2° C.

Da Øllet efter den Tids Forløb blev aftappet paa vel rensede Flasker, var det dog klart og uden mindste Tegn til Gjærtykhed som det Øl, der gaar i Handelen. Dette gjaldt om alle Foustager, A, B og C. Endnu efter 12 Døgns Henstand ved almindelig Stuevarme viste ingen af Flaskerne Tegn til Sygdom. Det stærkt inficerede Øl holdt sig, kort sagt, ligesaa godt som det ikke inficerede. Resultatet blev altsaa det selvsamme som ved Forsøgene med de smaa Maal i Laboratoriet.

Ved saadanne Undersøgelser som de foreliggende, hvis Øjemed er at gribe direkte ind i Praxis, er det naturligvis ønskeligt, saa vidt som muligt, at indrette Experimenterne efter de Forhold, der findes i den praktiske Drift selv. Dette frembød ikke nogen Vanskelighed med Hensyn til det nærmestforegaaende Spørgsmaal. Hvad derimod det først undersøgte Spørgsmaal om Betydningen af Infektionen, naar den foretages ved Hovedgjæringens Begyndelse, angaar, da maatte Sagen naturligvis stille sig anderledes. Der kunde her selvfølgelig ikke, i hvor ønskeligt det end var, være Tale om at foretage Experimenterne i selve Bryggeriet; thi dette vilde efter al Sandsynlighed temmelig hurtigt have bragt Sygdommen ind i alle Gjæringskjælderne og saaledes fremkaldt stor Forstyrrelse og store Tab. For dog at komme Forholdene i Bryggerierne saa nær som muligt, besluttede jeg at gjentage Forsøgene, der, som foran beskrevet, vare udførte i Laboratoriet i det Smaa, med større Maal og saaledes, at det gjærede Øl kunde lagres i Foustager i Bryggeriets Lagerkjælder. Ved disse nye Forsøg havde jeg desuden til Hensigt at tilvejebringe Oplysninger om, hvor store Mængder af Sygdomsgjær, der maa være tilstede i Paasætningsgjæren, hvis Sygdommen skal kunne træde frem, og endelig hvilken Indflydelse en ringere eller stærkere Attenuation i Hovedgjæringen samt en kortere eller længere Lagringstid maatte udøve.

Nedenstaaende meddeles et Exempel paa de med disse Spørgsmaal for Øje udførte Forsøg:

I en Afdeling af Carlsberg Laboratorium findes opstillet to Pasteurske Gjæringskar, A og B (en i nogle Retninger forbedret Kopi af det i Études sur la bière p. 328 beskrevne Kar); de ere begge af samme Størrelse og overhovedet ens. Temperaturen var i dette Lokale i Januar 7—10° C. I hvert af Karrene blev der anbragt 165 Liter luftet Urt (13,5 % Ball), som den i Bryggeriet benyttes til almindeligt Lagerøl. Til Karret A blev der sat 660 Gr. tykflydende Gjær af Sacch. cerevisiæ (Undergjærform fra Bryggeriet)

og til det andet Kar, B, 644 Gr. af den samme Gjær og desuden 16 Gr. tykflydende Gjær af Sacch. ellipsoideus II. Sidstnævnte Gjær var avlet ved samme Temperatur som den anvendte Sacch. cerevisiæ; begge Arters Celler vare unge og kraftige. Mængden af den tilsatte Gjær var i Forhold til Urtens Mængde den samme, som der anvendes i Bryggeriet. Urtens Temperatur, da Gjæren blev sat til, var 7° C. Vedtagningen fandt Sted i begge Karrene efter omtrent et Døgns Forløb. I Løbet af Hovedgjæringen steg Temperaturen i begge Karrene indtil 10° C.

Efter 8 Døgns Henstand var Extraktmængden i A 7,6, i B 7,5 % Ball. De to Ølsorters Udseende og Smag var ens. Fra hvert af Karrene blev en Foustage paa 66 Liter fyldt med vedkommende Øl og derpaa lagt ned i Lagerkjælderen; dennes Temperatur var 2° C.

Den øvrige Del af Øllet i de to Kar blev derpaa overladt til en fortsat Gjæring. Efterat denne ialt havde varet 10 Døgn, var Extraktmængden saavel i A som i B 6,7 % Ball. Øllets Udseende og Smag var den samme som for to Døgn siden; det blev aftappet paa 4 mindre Foustager, nemlig to fra hvert Kar, og derpaa ligesom de første Portioner bragt ned i Lagerkjælderen.

Øllet i de to store Foustager, hvis Extraktmængde ved Lagringens Begyndelse var c. 7,5 % Ball., indeholdt efter 2$^{1}/_{3}$ Maaneds Forløb 6 % saavel i A som i B. Det blev aftappet paa rene klare Flasker af farveløst Glas, som derpaa bleve stillede ind i et Skab i Mørke i Laboratoriet, altsaa udsatte for almindelig Stuevarme. Strax efter Aftapningen vare ligesom tidligere begge Ølsorter uden Spor af Gjærtykhed, men allerede efter 1 Døgns Henstand kunde man ved opmærksom Betragtning skimte en begyndende Gjærtykhed i B. Efter 5 Døgns Henstand var sidstnævnte tydelig gjærtyk, A derimod ikke.

De 4 mindre Foustager, hvis Extraktmængde var 6,7 %, da de bleve bragte ned i Lagerkjælderen, indeholdt efter 3 Maaneders Forløb 5,9 %. Øllet af A og B saa ud til at være ens; det var klart og uden kjendelig Gjærindblanding. Fra to af Foustagerne blev det ligesom i det foregaaende Tilfælde aftappet paa Flasker og disse henstillede i det omtalte Skab. Sygdommen viste sig ikke. Endnu efter 12 Døgns Henstand var Øllet saavel af B som af A klart og uden nogen Gjærtykhed.

De tilbageblevne to Foustager bleve liggende $^{1}/_{2}$ Maaned længere; deres Lagringstid strakte sig altsaa over 3$^{1}/_{2}$ Maaned. Analysen med Saccharometeret angav samme Extraktmængde som hos de to foregaaende Foustager. Resultatet blev ogsaa i alt

Væsentligt det Samme: Efter 16 Døgns Forløb viste der sig endnu intet Spor af Sygdommen. Øllet var, som man kunde vente, paa Grund af den længere Lagring, blankere end i de foregaaende Tilfælde.

Denne Forsøgsrække lærer os, at **Sygdommen endnu kan indtræde, naar Sacch. ellipsoideus II udgjør 1/41 af Paasætningsgjæren, dog kun hvis Øllet føres i Lagerkjælderen med en Extraktmængde af mindst 7,5 % Ball., og hvis Lagringen under disse Forhold afbrydes allerede efter 2 1/3 Maaneds Forløb. Fortsættes derimod Gjæringen i Gjæringskjælderen, saa at Extraktmængden indskrænkes til 6,7 %, og lagrer man dette Øl mindst i 3 Maaneder (altsaa normal Fremgangsmaade), vil Sygdommen ikke vise sig.**

Det maa derfor tilraades saadanne Bryggerier, i hvilke denne Sygdom har sneget sig ind, at sørge for en tilstrækkelig stærk Attenuation i Hovedgjæringen og en ikke for kort Lagringstid (for almindeligt Lagerøl mindst 3 Maaneder). Indeholder Paasætningsgjæren derimod en betydelig Mængde af Sygdomsgjæren, vil dette dog ikke være tilstrækkeligt.

Det beskrevne Forsøg blev gjentaget, men med den Forandring, at der til Paasætningsgjæren til Karret B var sat 1/41 af Sacch. Pastorianus III i Stedet for af Sacch. ellipsoideus II. Hovedresultatet blev det samme, dog syntes saavel i dette som ogsaa i nogle af de andre Forsøg, sidstnævnte Gjærart at være den værste af de to.

Har normalt undergjæret Øl, der er brygget ved Hjælp af en Renkultur af Sacch. cerevisiæ, staaet aftappet paa Flasker i længere Tid ved almindelig Stuevarme, saa vil det som Regel danne et temmelig betydeligt Gjærbundfald, men ved Rystning bliver Vædsken dog ikke uigjennemsigtig og plumret. Gjærlaget sønderdeles nemlig i smaa Klumper og Brokker, uden at de enkelte Celler i nogen kjendelig Grad skilles ad og flyde ud i Vædsken, og hurtigt synke atter alle disse Smaadele til Bunds. Paa anden Maade forholder derimod det Bundfald sig, som det foran beskrevne syge Øl hurtigt danner. Det ligger nemlig ikke fast, men ved en ringe Bevægelse i Vædsken stiger der ligesom en hel Sky af enkelte Celler op. Er Øllet i højere Grad angrebet, og man ryster stærkt, saa bliver Vædsken følgelig ligesom opfyldt med Mudder. Det vil sige: Der kan godt i det sunde Øl findes ligesaa stort Gjærbundfald som i det syge, uden at man dog derfor finder det udrikkeligt.

Har et Bryggeri, som har lidt af dette Onde, igjen faaet sin Drift i god Gang ved Hjælp af en fuldstændig Udrensning i Gjæringskjælderne og ved derefter at indføre god Gjær, saa maa der nøje vaages over, at Sygdommen ikke atter føres tilbage fra Bærmen i Lagerfadene.

I flere Bryggerier ser man, at der slet ingen Hensyn tages i den Retning. Bærmen spildes i Gaarden og bringes direkte ned i Gjæringskjælderne navnlig med Folkenes Fodtøj, eller den tørrer ind derude til Støv og føres som saadan af Vinden op paa Svalebakkerne. Herfra naa da en Del af Sygdoms-Organismerne ned i Gjæringskarrene, hvor de begynde at udvikle sig. I Begyndelsen gaar det vel meget langsomt, saa slet ingen Fare mærkes, men efterhaanden ophobes der flere og flere Celler, og tilsidst findes der saa megen vild Gjær i Paasætningsgjæren, at Sygdommen kan bryde frem. Fra det Øjeblik tager Udviklingen fat med rivende Fart og snart vil Bryggeriets hele Ølforraad paany være angrebet. Det er saadanne Tilfælde, der bevirke, at man i Bryggeriverdenen ofte kan høre Sygdommen omtalt næsten som noget Mystisk: »Kommer den, saa maa man bøje sig derfor, og det nytter egentlig ikke at stride dermod, det er et Uheld, som ingen kan værge sig for«. Der skiftes da Gjær, og hjælper den nye Gjær fra Bryggeriet A ikke, saa søger man til B o. s. v. Men at Kampen maa tages op i selve Driften, tænker sjeldent Nogen paa.

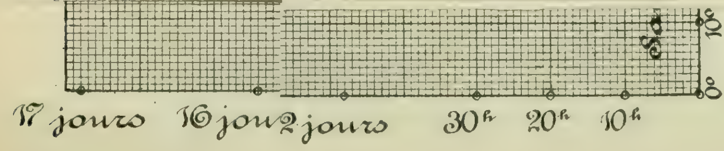
Ogsaa andre Arter end Sacch. Pastorianus III og Sacch. ellipsoideus II kunne sandsynligvis fremkalde Gjærtykhed i Øl. Jeg har allerede i nærværende Tidsskrifts I B. 4 Hefte, p. 413, udtalt den Formodning, at dette f. Ex. vistnok gjælder om den der omhandlede Art af Gruppen Pastorianus. Her kan det være passende at minde om, at Gjærtykheds-Fænomenet optræder under flere Former. Der indbefattes herunder en hel Række forskjellige Sygdomme.

Den sidst omtalte Sacch. Pastorianus gav os ligeledes et karakteristisk Exempel paa, at visse Saccharomyces-Arter kunne frembringe Øl med en for Kjendere ubehagelig Smag.

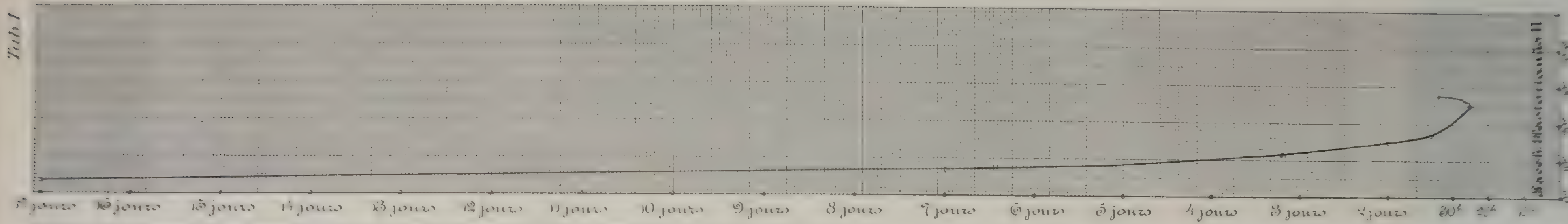
Uklarhed i Øl skyldes langtfra altid Organismer. Temmelig almindelig er f. Ex. den Art Uklarhed, som viser sig deri, at klart Øl, naar det udsættes for en lav Temperatur, bliver opaliserende, uigjennemsigtigt og først efter at være blevet opvarmet atter faar sin Klarhed tilbage. Fænomenet forklares derved, at der i Kulden udskilles Proteinstoffer, hvilke derpaa atter, naar vedkommende Vædske bringes ind i Varmen, opløses.

Opaliseringen kan hidrøre fra flere Aarsager. Under visse Forhold har det vist sig, at en temmelig ringe Indblanding af den foran omtalte Sacch. Pastorianus III i Paasætningsgjæren kan forhindre Øllet i at blive opaliserende. Medens saaledes Øl, der var gjæret ved Hjælp af en Renkultur af Sacch. cerevisiæ, blev stærkt opaliserende og ikke opnaaede nogen Klarhed, endog efterat det i flere Dage havde staaet ved almindelig Stuevarme, var det tilsvarende Øl, der var fremstillet paa selvsamme Maade som det netop omtalte, men kun med den Forskjel, at en lille Del af Paasætningsgjæren udgjordes af Sacch. Pastorianus III, strax efter Aftapningen i den kolde Lagerkjælder aldeles klart og vedblev at være det. Den vilde Gjærart maa altsaa under Eftergjæringen antages at have fjernet de Stoffer, der i det førstnævnte Øl bevirkede, at det blev opaliserende. Omvendt viste det sig i andre Forsøg, at to Gjærformer, som hver for sig gave klart Øl, derimod, hvis man blandede dem sammen, da frembragde opaliserende Øl. Disse og andre lignende Spørgsmaal ville efterhaanden blive underkastede en nøjere Behandling her paa Laboratoriet.

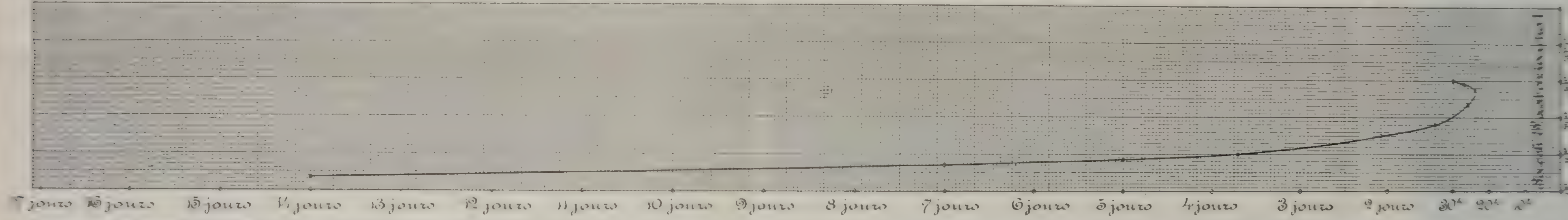
Saccharomyces - Arterne indeholde overhovedet vigtige Problemer for Gjæringsindustrien og frembyde i den Retning, idetmindste for Øjeblikket, større Interesse end Bakterierne, men hidtil har hele dette Omraade ligget som et næsten aldeles ukjendt Land.


17 jours
16 jours
2 jours
30h
20h
10h
Sa
0°
10°

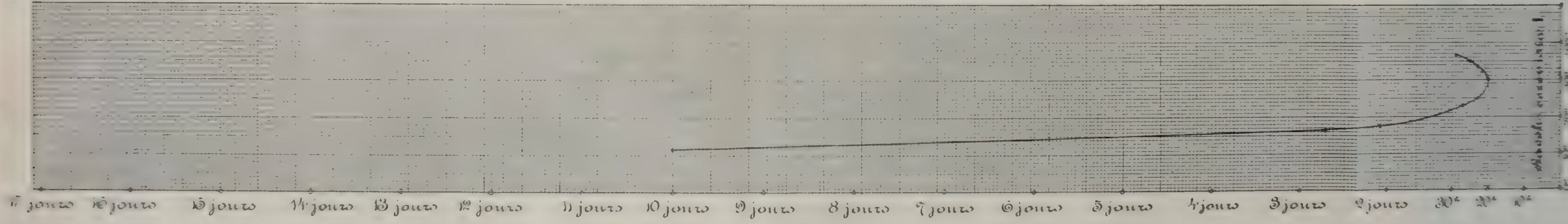
Tab I



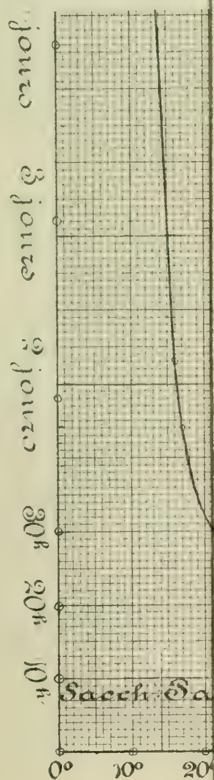
jours
16 jours
15 jours
14 jours
13 jours
12 jours
11 jours
10 jours
9 jours
8 jours
7 jours
6 jours
5 jours
4 jours
3 jours
2 jours
30h
20h



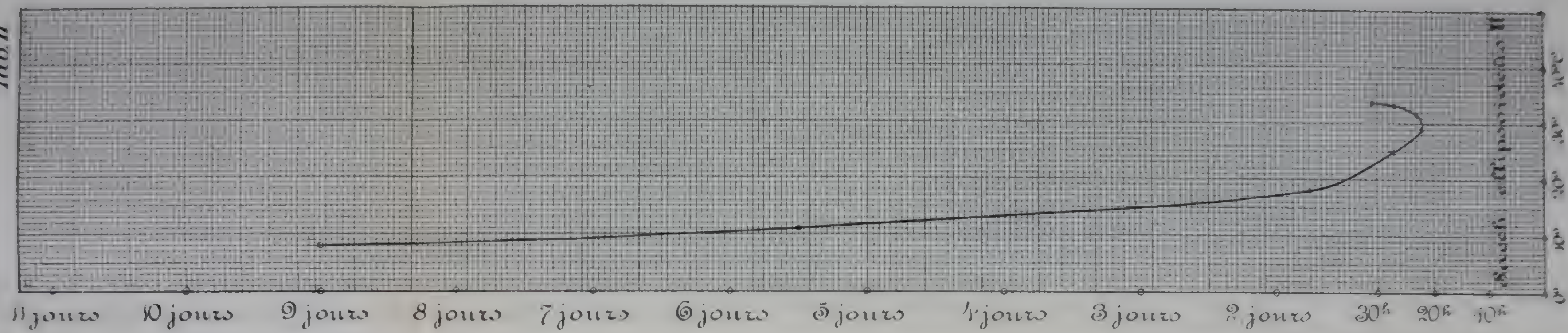
jours
16 jours
15 jours
14 jours
13 jours
12 jours
11 jours
10 jours
9 jours
8 jours
7 jours
6 jours
5 jours
4 jours
3 jours
2 jours
30h
20h
10h

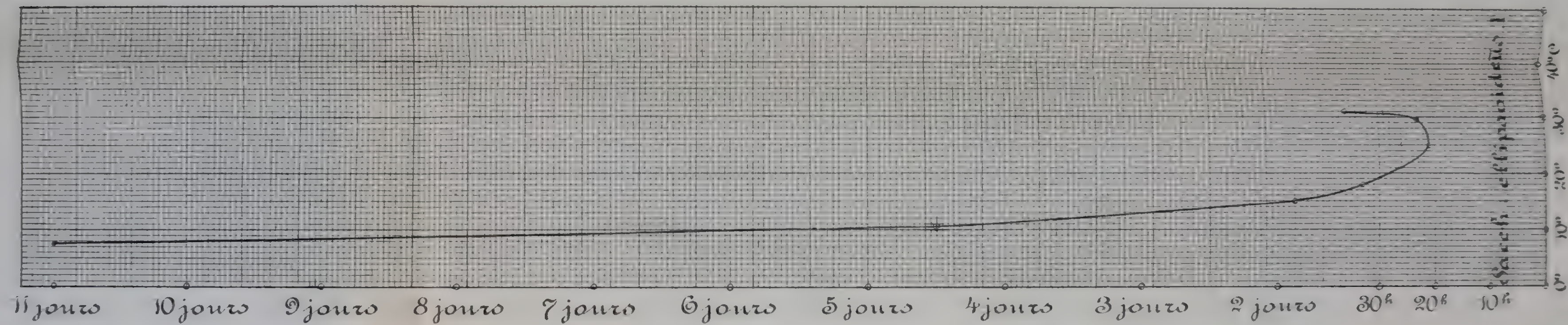


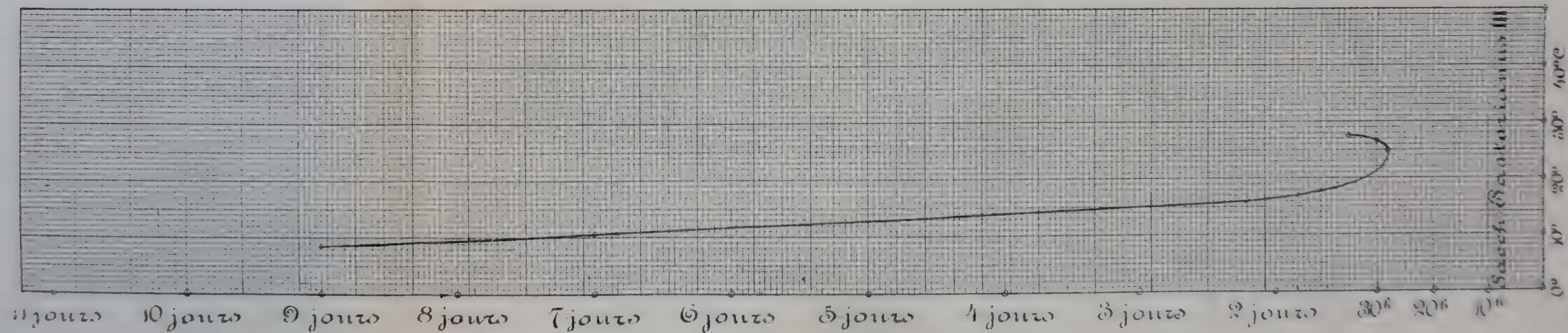
jours
16 jours
15 jours
14 jours
13 jours
12 jours
11 jours
10 jours
9 jours
8 jours
7 jours
6 jours
5 jours
4 jours
3 jours
2 jours
30h
20h
10h


0° 10° 20°
Sacch. Sa

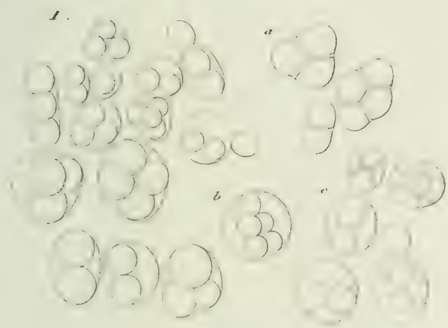
Tab. II

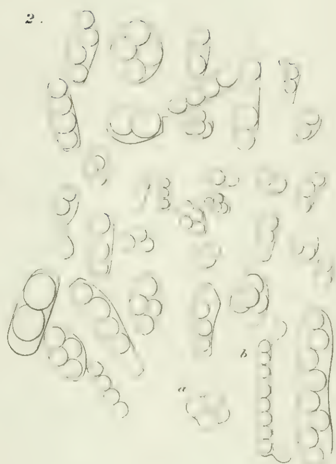

Sacch. ellipsoideus II
0° 10° 20° 30° 40°C
11 jours 10 jours 9 jours 8 jours 7 jours 6 jours 5 jours 4 jours 3 jours 2 jours 30h 20h 10h

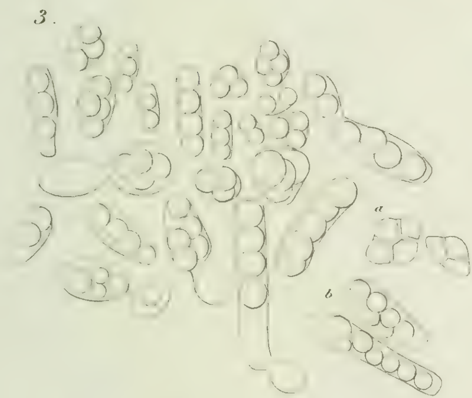

Sacch. ellipsoideus I
0° 10° 20° 30° 40°C
11 jours 10 jours 9 jours 8 jours 7 jours 6 jours 5 jours 4 jours 3 jours 2 jours 30h 20h 10h

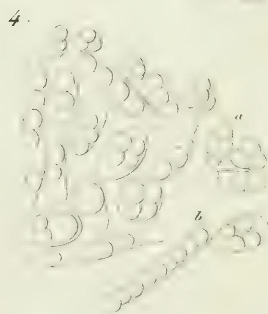

Sacch. Pastorianus III
0° 10° 20° 30° 40°C
11 jours 10 jours 9 jours 8 jours 7 jours 6 jours 5 jours 4 jours 3 jours 2 jours 30h 20h 10h

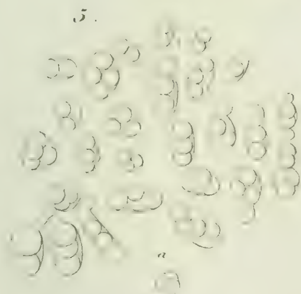
Tab. III.

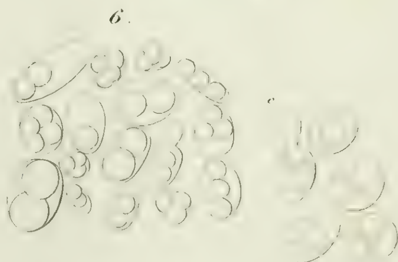












Emil Chr Hansen ad nat del

Lovendal sc

20212

Om Frøhviden og dens Udvikling hos Byg.

Anatomiske Forstudier til Spørgsmaalet om melet og glasset Korn.

Af

W. Johannsen.

De her meddelte Studier danne en Art Indledning til de Bygundersøgelser, som det, kort efter min Ansættelse som Assistent ved Carlsberg Laboratoriets kemiske Afdeling, overdroges mig at udføre.

Hovedopgaven, at udfinde Aarsagerne til, at Korn snart blive »melede«, snart »glassede«, for derved at nærme sig »Melbygspørgsmaalets« praktiske Løsning, er endnu langt fra at være besvaret, medens de mikroskopiske Undersøgelser have naaet en vis Afslutning. Derfor meddeles disse for sig, saa meget mere, som mit Arbejde ved Laboratoriet vil blive afbrudt i et Aars Tid paa Grund af en Udenlandsrejse.

Ved Offentliggjørelsen af denne første Meddelelse maa jeg bringe den varmeste Tak til mine tre Lærere, Hr. Laboratorieforstander Kjeldahl, Hr. Docent R. Pedersen og Hr. Professor Warming; ligesom jeg skylder Hr. Capitain, Brygger J. C. Jacobsen megen Tak for talrige Oplysninger vedrørende Bygspørgsmaalet i dets Helhed.

Hvad specielt denne Forstudie angaar, da bør jeg tilføje, at de mikroskopiske Arbejder for en stor Del ere udførte under Hr. Professor Warmings velvillige Ledelse.

November 1883.

Her tages kun Hensyn til de dyrkede Bygsorter, som i alt væsentligt vise fuldstændig indbyrdes Overensstemmelse. Hordeum

distichon er især anvendt som Undersøgelsesmateriale; Afbildningerne ere tegnede efter Præparater af denne Art, med mindre andet angives. Alle Maalangivelser gjælde ligeledes den nævnte Art.

Ved Fremstillingen af mikroskopiske Præparater af unge Korn blev næsten altid den af Strasburger angivne Fremgangsmaade benyttet. Det friske Materiale (hele Ax) blev overgydt med en rigelig Mængde absolut Alkohol, hvori det henstod flere Maaneder for at hærdes. Derpaa bleve de enkelte Frugtknuder udtagne af Avnerne og lagte i en Blanding af lige Rumfang Alkohol og Glycerin; i denne Blanding forblev Materialet mindst 3 à 4 Dage, ofte meget længere, inden Snittene fremstilledes.

For at være sikker paa, at hele denne Fremgangsmaade ikke bevirkede væsentlige Forandringer i Objekternes finere Struktur, foretoges hyppigt Sammenligninger med friskt Materiale, naar saadant stod til Tjeneste. Disse Sammenligninger faldt stedse ud til Gunst for Strasburgers Fremgangsmaade, der ogsaa maa anbefales meget paa Grund af den store Lettelse, den yder ved Tilvejebringelsen af tynde, sammenhængende Snit, især naar de paagjældende Objekter anbringes mellem Stykker af Hyldemarv, og Kniven vædes med Alkohol-Glycerin.

De anvendte Reagenser ere, med mindre andet siges, tilberedte efter V. A. Poulsen: Botanisk Mikrokemi, Kjøbenhavn 1880.

Byggens Frugtknude er, som de andre Græssers, énrummet, med ét Æg, som sidder umiddelbart fast paa Frugtknudens Bugside[1]) (Furesiden), der vender mod øvre Inderavne. En egentlig Ægstræng findes altsaa ikke; det siddende Æg er fæstet til Frugtknudevæggen ved en temmelig lang Tilhæftningslinie og har en lang Kjærnefod (»Chalazaegn«).

Fire Strænge gaa op igjennem Frugtknuden, én forløber i Ryggen lige overfor Bugsømmen, noget under en svag Indbugtning af Frugtknuden (sml. Tab. I, Fig. 3 a.), de to andre ligge langs Frugtknudens Sider og tabe sig først oppe i Arrene (sml. Fig. 2 c. og 3 b. c.), medens den først nævnte Stræng tidligt bliver utydelig. Den fjerde Stræng, som er den kraftigste og viser tydelige Kar, løber i Bug-

---

[1]) Undertiden kaldes Bugsiden med Urette Rygside, f. Ex. af Holzner (Der bayrische Bierbrauer. 1876. S. 199 o. a.), der taler om »Rygsømmen« (Dorsalnaht) i Stedet for »Bugsømmen«. Om denne Betegnelse se Warming: Den almindelige Botanik, Kjøbenhavn 1880. S. 195. I denne Bog, ligesom i samme Forfatters »Haandbog i den systematiske Botanik«. Kjbh. 1879, maa Betydningen af de her benyttede Betegnelser søges. Angaaende Æggets Bygning i Almindelighed o. s. v. henvises ligeledes til de to Værker.

sommen, lige udenfor og parallelt med Æggets Tilhæftningslinie; den taber sig lidt efter lidt.

Paa Tværsnit (sml. Fig. 3 e.) sés Tilhæftningslinien som et smaacellet Parti, hvorfra de to Æghinder, Ægkjærnens Overhud, samt Frugtknudens indre Epidermis udspringe.

Hele den over Ægrummet værende Del af Frugtknuden er bladgrøntfri og besat med talrige én- og flercellede, ofte forgrenede, spidse og stive Haar, der give dette Parti et skinnende hvidt Udseende, medens den Ægrummet omgivende Del af Frugtknuden er grønlig paa Grund af et Par Lag Bladgrønt førende Celler i det indre Parenkym.

Paa begge Sider af og tæt op til Bugsømmen ere de Bladgrønt førende Celler tilstede i stort Antal; paa et Tværsnit ses derfor med svag Forstørrelse (Loupe) en mørkegrøn Plet ved Bugsømmen, som dog selv er ufarvet.

Frugtknudens øverste Parti er ved en Sænkning adskilt i to Dele, den mod øvre Inderavne vendte Del er meget højere end den forreste (sml. Fig. 1) og atter (sml. Fig. 2) spaltet i en til højre og en til venstre stillet Lap, som hver især gaar ud i et kraftigt, fjerformig haaret Ar. Mellem de to først nævnte Dele eller Hovedafsnit gaar en smal, lodret Spalte eller Kanal dybt ned i Frugtknuden, næsten hen til Hulrummet, i hvilket Ægget er anbragt.

Ægget er noget S-formet krummet; naar man paa et Længdesnit (Fig. 1) gaar ud fra Tilhæftningslinien, hæver det sig nemlig først, bøjer derpaa nedad, og endeligt ud imod den Kjærnefoden modsatte Side af Frugtknuden, saaledes at Kimmunden ikke vender nedad, men udad[1]).

Fra Æggets øverst liggende Punkt løbe de to Æghinder ud i en Spids, der gaar højt op i det fra Arrene kommende, ledende Cellevæv. Dette Forhold, som iagttages, naar man betragter veltrufne Længdesnit eller Rækker af saadanne, især efter Behandling med Kalilud, er, saavidt mig bekjendt, hidtil bleven overset. Hver af Æghinderne bestaar af to Lag Celler. I den omtalte Spids (sml. Fig. 11), og tillige ved Kimmunden, hvor den ydre Hinde har en stor Aabning, medens kun en fin Spalte gaar igjennem den indre[2]),

---

[1]) Sml. Payer: Organogénie de la fleur. Paris 1857. S. 703; ligeledes Hofmeister: »Neue Beiträge z. Kenntniss d. Embryoentwickelung d. Phanerogamen. II.« i Abhdl. d. k. sächs. Ges. d. Wiss., VII. Bd. S. 651.

[2]) Nörners Afbildning af Kimmunden hos Hord. vulg. (Flora 1881. Tab. II, Fig. 1) er ikke nøjagtig.

have begge Hinder dog flere Lag Celler. I det omtalte Topparti var det mig ikke muligt at afgjøre, hvorledes den ydre Hindes to Lag have forholdt sig; af den indre Æghinde har det yderste Cellelag ikke delt sig; derimod det indre.

Hos Rug og Hvede findes tilsvarende Forhold, dog er Toppen hos den sidste langt mindre spids, hvilket staar i Forbindelse med, at Hvedefrugtknudens øverste Parti er langt lavere end Byggens.

Den ydre Æghinde er i den udviklede Frugtknude, allerede før Bestøvningen sker, meget blød og fattig paa Indhold i de klart gjennemskinnelige, tyndvæggede Celler. Det synes, at denne Hinde tjener som ledende Væv for Støvrøret, efter at dette er traadt ind i Frugtknudens Hulhed[1]).

Fra Arrene gaa de egentlige ledende Væv, idet de nærme sig hverandre, ned gjennem det Indre af de arbærende Afsnit (sml. Fig. 2). De to Veje mødes endnu i denne bageste Del af Frugtknudens øvre Parti (sml. Fig. 1) og gaa derpaa, forenede, videre ned mod Hulrummet. Kort førend dette og Æghindernes Spids naas, træder det ledende Væv ogsaa over i det forreste Afsnit. Den lodrette, fine Spalte omgives derved forneden af ledende Væv, af hvilken Grund den gjøres utydelig. Det ledende Vævs Celler ere bløde, tyndvæggede, smalle og meget langstrakte, samt ganske stivelsefri. Ved flygtig Betragtning skjule de den ydre Æghindes fine Spids.

Blomsterne hos de dyrkede Bygsorter aabnes under Bestøvningen langtfra altid hos os, maaske paa Grund af utilstrækkelig Varme i Blomstringstiden[2]). Naar det sker, da er det, i Overensstemmelse med Hackels almindelige Angivelser[3]), fordi Lodiklerne, de to smaa Skæl ved Frugtknudens Grund, svulme op og presse Avnerne lidt fra hverandre. Denne Aabnen er dog i det hele sjelden[4]).

[1]) Sml. Holzner i Botan. Centralblatt, 1882 Bd. 12, S. 107.

[2]) Sml. Godron: De la floraison des Graminées. Memoires de la société nationale des sciences nat. de Cherbourg. T. 17 p. 178.

[3]) Botanische Zeitung, 1880 S. 432.

[4]) Naar Kudelka (Entwickelung u. Bau d. Frucht- u. Samenschale unserer Cerealien. Berlin 1875. S. 9) angiver, at der hos Byggen kun finder Selvbefrugtning Sted, og at denne foregaar i den helt lukkede Blomst. endnu inden Axet har »skredet«, da er dette ingenlunde altid Tilfældet. At Fremmedbestøvning i Virkeligheden kan finde Sted, viser den interessante Bastardform mellem Hord. trifurcat. og Hord. distichon, som Hr. P. Nielsen d. 21/2 1883 foreviste i det kgl. d. Landhusholdningsselskabs Møde.

Derimod ses oftere en anden Opspærring af Bygblomsten, især hos storavnet Byg, Hord. macrolepis (i alt Fald dens sorte Varietet). Denne sidst omtalte Opspærring foregaar imidlertid ikke i Bestøvningens Interesse, men sker først efter Befrugtningen, naar Frugtknuden begynder sin nye Væxt[1]). Lodiklerne ere nu ganske sammenfaldne, men en stærk Udvikling af Frugtknudens øverste bladgrøntfri Del (sml. Fig. 4—7) trænger Avnerne ud fra hverandre. Denne Tilstand varer i nogle Dage; først lidt efter lidt, idet Frugtknuden voxer i Højde, og det øverste Parti skrumper noget ind, lukkes Avnerne paany.

Opsvulmningen af Frugtknudens øverste Del bevirkes neppe alene ved stærk Turgor, men, som det synes, ogsaa ved Væxt og Celleformering. Andre Græsser, saasom Rug, Marehalm, Rajgræs o. fl., vise lignende Forhold, især synes det almindeligt hos Etternølere sent paa Sommeren.

Før Befrugtningen findes i Kimsækken (Fig. 12) en Kimblære og to Synergider, temmelig smaa og utydeligt konturerede. Centralkjærnen er meget tydelig og ligeledes Antipodecellerne, der udvikles hurtigere end Kimblære og Synergider; de findes i et Antal af mindst 6.

Efter Befrugtningen, maaske endog forinden, begynde Antipodecellerne en rask Deling, Antallet af Kjærner stiger meget hurtigt; 31 bleve sikkert talte, rimeligvis findes flere. Samtidigt med Frugtknudens Tiltagen i Længde (Højde) og i Omfang, udvides Kimsækken hurtigt; den voxer i Begyndelsen noget ensidigt, idet især den mod Frugtknudens Ryg vendte Side forlænges stærkt og bøjes (Fig. 9—10). Derved forblive Antipodecellerne ikke længere i Bunden af Kimsækken, men komme til at ligge paa den ene Side af samme, ind imod Æggets Tilhæftningslinie[2]). Derpaa begynder Frøhvidedannelsen.

Trods særdeles talrige Præparationer har jeg ikke været saa heldig at træffe Centralkjærnen i Deling; der er imidlertid ingen Grund til at betvivle, at Strasburgers almindelige Angivelser ogsaa ville passe her (se Anm. [2])). Centralkjærnen frembringer da

---

[1]) Sml. Holzner: »Die Gerste« i »Der bayrische Bierbrauer«. 1876. S. 199. Wigand (Botanische Untersuchungen 1854) har den tilsvarende Angivelse for Rugens Vedkommende.

[2]) A. Fischer (Z Embryosackentwickelung einiger Angiospermen, Jenaische Zeitschrift f. Naturwiss. 14. Bd. 1880, S. 105, Tab. III, Fig. 22—29) har iagttaget en aldeles tilsvarende, ensidig Væxt af Kimsækken hos Erharta panicea. Sammesteds ere Centralkjærnens Delinger hos denne Art beskrevne.

ved gjentagne, hurtige Delinger en Mængde Døttrekjærner. Diss Kjærner, som stadigt ere lejrede i Protoplasma, beklæde snart son et Lag Kimsækkens indvendige Væg; kun der, hvor Antipode cellerne og Kimanlæget findes, ligger den unge Frøhvide ikke umiddel bart op til Kimsækkens Væg, hvilket ellers overalt er Tilfældet.

Frugtknuden er nu omtret 3,5 Millimeter lang. Fig. 3 viser e omtrent over Midten af Hulrummet lagt Tværsnit af Frugtknuder i dette Stadium, Fig. 8 et Brudstykke heraf ved stærkere Forstørrelse. Frugtknudevæggen[1]) bestaar her af følgende Cellelag: Overhud; farveløst Parenkym, som indeholder smaa Stivelsekorn; to (hist og her, især i Furens Nærhed, flere) Lag Bladgrønt førende, paa tværs strakte Celler; og endeligt den indre Epidermis. Derpaa følger den ydre Æghinde, som nu er sammenfalden og tildels forsvunden. Fig. 3 viser, at den holder sig længst paa Kornets Bugside. Den indre Æghinde har derimod endnu rigeligt protoplasmatisk Indhold og forholdsvis store, runde Cellekjærner i begge sine Lag, ligesom den umiddelbart indenfor værende Ægkjærnes Overhud. Indenfor denne sidste ses nogle sammenfaldne Celler, Resten af Ægkjærnen, som nu for største Delen er fortrængt af den mægtigt voxende Kimsæk. Dennes Væg træder ikke tydeligt frem imod det Lag af Protoplasma, hvori den unge Frøhvides Cellekjærner ere lejrede. — Alle Dele af Ægget, inclusive dets Hinder og Tilhæftningsstedet, ere fuldstændigt stivelsefri og ufarvede.

Et tilsvarende Længdesnit vil give et noget andet Billede af de enkelte Cellelag. De farveløse Parenkymceller vise sig da med temmelig rette Vægge; de ere stillede i Længderækker og noget strakte efter Frugtknudens Længderetning. De Bladgrønt førende Celler vise sig derimod næsten kredsrunde. Der er ikke stor Forskjel mellem Længdesnit og Tværsnit af de øvrige Cellelag, der som Regel ere noget strakte i Retning af Frugtknudens Længdeaxe. Frøhvidens Kjærner frembyde samme Billede paa Længde- som paa Tværsnit.

I »Skallen« er der siden Befrugtningen sket nogle Forandringer ved den Væxt, som hele Frugtknuden har undergaaet. Parenkymcellerne ere i det afbildede Stadium blevne betydeligt større end

[1]) Sml. herom Kudelkas alt anførte Afhandling, samt Grønlund: Om Maltbyg og Glasbyg. Kjbh. 1879, S. 29—32. Hr. Laboratoriebestyrer Grønlund har med særdeles Imodekommen tilladt mig at gjennemgaa hans udførligere, utrykte Angivelser og Afbildninger, der særligt gjælde »Skallens« Udvikling. Jeg maa her udtale min Tak for denne Velvillie. Med Hensyn til Skallen er der i alt væsentligt fuldstændig Overensstemmelse mellem Hr. G.'s og mine Iagttagelser.

de vare før Befrugtningen; de ere løsnede lidt i deres indbyrdes Sammenhæng. Ogsaa de Bladgrønt førende Celler ere nu større end tidligere. Den ydre Æghinde er meget mere sammenfalden, Karstrængen i Bugsømmen kraftigere end før Befrugtningen.

Naar man ved et Snit aabner Frugtknuden, kan man let, ved Hjælp af Naalen, i en Draabe Glycerin udpræparere et Stykke af Kimsækkens Belægning (Fig. 16). Man vil da finde, at Cellekjærnerne aftage i Størrelse, jo nærmere de ere Antipodecellerne. Dette viser, at Kjærnedelingen i de nærmest Antipodecellerne liggende Egne af Frøhviden er videst fremskreden. I Overensstemmelse hermed dannes Cellevæggene ogsaa tidligst i Antipodernes Nærhed, altsaa ud for Furen. At dette staar i Forbindelse med en særlig rigelig Ernæring, er vel sandsynligt; det maa ogsaa erindres, at Antipoderne, som ere meget protoplasmarige, efterhaanden svinde hen.

Idet den unge Frøhvide udvikles videre, fortrænges Ægkjærnen mere og mere. Frugtknuden voxer tillige, især i Længden (Højden)[1]; Cellerne, undtagen de Bladgrønt førende, strækkes meget betydeligt i denne Retning. Ved Hjælp af Naalen kan man let udbrede hele Flager af Frøhviden i en Draabe Glycerin, og saaledes iagttage de forskjellige Stadier af Vægdannelsen, som stemme nøje med Strasburgers almindelige Angivelser.

Naar der er dannet Vægge, begynde de unge Frøhvide-Celler at strække sig radialt ind imod Kimsækkens Hulhed. Fig. 13 viser et Tværsnit af Frøhviden i det omtrent 4,5 Millimeter lange Korn; Fig. 15 et Længdesnit af hele Frugten ved svag Forstørrelse. Det sés, at Frøhviden er fremmeligst i sin Udvikling ved Fureegnen, hvor den er i umiddelbar Berøring med de nu halvt resorberede, paa Figuren ikke angivne Antipodeceller.

Fig. 14 viser en Del af Fig. 13 ved stærkere Forstørrelse. Væggene ere meget tynde og ligesom noget krøllede (rimeligvis skyldes dette Alkoholens Indvirkning), Kjærnerne have ejendommelige, langstrakte Former, tydende paa en forestaaende Deling. Fig. 17 viser forskjellige Kjærner, deriblandt nogle i Delingens senere Stadier. Forbindelsestraadene mellem de nydannede Dottrekjærner danne ikke her den almindelige, tøndelignende Figur[2]), men løbe i

---

[1]) Holzner (»Die Gerste . . .« S. 200) har flere Maalangivelser fra forskjellige Udviklingsstadier, som bekræfte dette.

[2]) Sml. Afbildningerne i Strasburger: Zellbildung und Zelltheilung. 3. Aufl. 1880, eller f. Ex. Fig. 9 G. H. i Warming: Den almindelige Botanik. 1880. S. 9.

Nærheden af Kjærnerne nær ved og parallelt med hverandre (sml. *e*, *f* og *g*). — Samtidigt med at Frugtknuden stadig fortsætter sin Længdevæxt, kun tagende lidet til i Omfang, fyldes Kimsækken helt med Frøhvideceller, idet disse dele sig og ved deres Væxt udfylde Hulrummet. Idet Frøhvideceller fra modsatte Sider støde sammen i Kimsækkens Midte, danne de en tydelig Sammenvoxningslinie (sml. Tab. II, Fig. 1). Fureegnen er stadig videst fremme; allerede nu (Kornets Længde omtrent 5 à 5,5 Mm.) har Frøhvidens yderste Cellelag her differentieret sig, er overfyldt med Proteinstof og viser kun utydeligt Protoplasmastrænge. Tab. II, Fig. 2 viser et Par Celler fra Kornets Rygside. Kjærnerne ere ophængte i tydelige Plasmastrænge; Væggene synes mere faste end i det tidligere omtalte Stadium. Stivelse findes der ikke Spor af endnu. Nogle Delinger, som synes at ske samtidigt eller næsten samtidigt over hele Frøhviden, foregaa endnu, derpaa begynder Stivelsen at dannes.

Kornet har da naaet en Længde af 6 à 7 Mm. og er begyndt at voxe stærkere i Omfang end tidligere. Fig. 3 viser et svagt forstørret Tværsnit af et saadant Korns Frøhvide. »Sammenvoxningslinien« er endnu tydelig, senere kan den ikke mere paavises. Fig. 4 gjengiver et Længdesnit, meget svag Forstørrelse. Stivelsekornene findes tidligst i de øvre Dele af Frøhviden, dog ikke helt oppe i Spidsen af Kornet. Tværsnittet, Fig. 3, der er lagt noget over Kornets Midte, viser, hvor Stivelsekornene først kunne paavises, nemlig omkring Sammenvoxningslinien i Midten af Kornets to Længdehalvdele (Fløje) og i to henad Furen liggende Partier. I hele Frøhvidens yderste Lag Celler findes aldrig Stivelse, derimod findes allerede paa dette Stadium noget Fedt, foruden det rigelige, svagt grynede, protoplasmatiske Indhold.

Fig. 5 viser en Del af Fig. 3 i stærkere Forstørrelse. Af det yderste, indholdsrige Lag fremgaa senere de tykvæggede, i tre Rækker stillede, stivelsefri Celler. I Cellerne nær Sammenvoxningslinien, som begrænser Fig. 5 forneden, sés fine Gryn i Protoplasmaet omkring Kjærnen og i de nærmest denne værende Dele af Plasmastrængene. Ved Jod[1]) farves de svagt og utydeligt. Anvendes derimod Klorzinkjod, da bolne de smaa Korn ud og farves

[1]) Den anvendte Jodopløsning fremstilles saaledes: Til 1 Del Jod, opløst i 20 Dele Alkohol, sættes 80 Dele Vand. Efter 1/2 Times Henstand filtreres Vædsken fra det udskilte Jod. En saadan svag Jodopløsning er det i mange Tilfælde mere tilraadeligt at anvende, end stærkere Opløsninger; Farvningen sker langt mere jævnt og smukt.

stærkt brunsorte. Fig. 6 fremstiller nogle Celler, udpræparerede med Naalen og behandlede med Klorzinkjod; Væggene ere derved løsnede noget fra hverandre.

Umiddelbart førend Stivelsen saaledes kan paavises ved Klorzinkjod eller Kali og Jod, er Protoplasmaet omkring Cellekjærnen fint grynet; man har maaske her de Schimperske »Stivelsedannere« i en meget ufuldkommen Skikkelse. Paa det tilsvarende Stadium af Havrens Udvikling saas i frisk Materiale smaa runde Legemer, der farvedes brune ved Jod, og hvori Stivelse snart efter kunde paavises som smaa fra hverandre adskilte Korn, der vel senere maa voxe sammen for at danne Havrens sammensatte Stivelsekorn. I Alkoholmateriale har jeg dog ikke siden kunnet gjenfinde disse Legemer.

Efter at Stivelsen først er begyndt at dannes i Frøhvidecellerne, synes disse ikke at dele sig mere. I alt Fald saas ikke Stivelsekorn i nogen i Deling værende Celle. Derimod foregaa Delinger i de endnu stivelsefri Partier af Frøhviden, især i Omkredsen, hvor de karakteristiske, Fedt og Proteinstoffer førende Celler snart differentiere sig.

Tab. III, Fig. 7, b viser et Tværsnit af et omtrent 8,5 Mm. langt Korn. Til Sammenligning med Fig. 7, a ses, at Kornet nu ogsaa er tiltaget meget i Omfang. Tab. II, Fig. 8 viser en Del af et lignende Præparat i stærkere Forstørrelse. Det sés strax, at det yderste Cellelag ved radiale og tangentiale Vægge er delt i mindre, stærkt fyldte Celler, uden kjendelige Plasmastrænge og med et grynet Indhold. Disse ere de saakaldte »Glutenceller« i endnu ufuldkommen Udvikling. Tab. II, Fig. 10 viser de samme Celler, saaledes som de præsentere sig ved tangentiale Snit. Paa den Led ligge de meget uregelmæssigt, medens de paa Tværsnit, men dog især paa Længdesnit, frembyde en mere regelmæssig Ordning. De føre nu en betydelig Mængde Proteinstof og Fedt; tydeligt begrænsede Proteinkorn kunne dog endnu ikke paavises i det grynede Indhold.

Indenfor disse Celler følge de Stivelse førende. Stivelsekornene ere ældst og størst i Cellerne henimod Kornets Indre, yngst og mindst nær Omkredsen. De ere aflange, noget uregelmæssigt formede, medens den helt udviklede Frøhvides Stivelsekorn ere temmelig regelmæssigt linseformede. De mange smaa Korn, som i den færdige Frøhvide findes mellem de store Stivelsekorn, især i de indre Celler, ere endnu ikke opstaaede. Cellekjærnerne ere særdeles tydelige endnu, derimod sés Plasmastrængene ikke godt. At de imidlertid ere tilstede, paavises let ved Farvningsmidler, eller

ved at fjerne Stivelsen, f. Ex. ved fortyndet Salpetersyre (10 %). Man sér da et tydeligt, om end fint Netværk. De Stivelse førende Cellers indad gaaende Vægge løbe paa Fig. 8 ikke i nøje radial Retning fra Omkredsen. Afbildningen gjengiver nemlig et Parti fra Siden af Frugtknuden, hvor de nævnte Vægge, paa Grund af Frøhvidens uensartede Væxt og deraf følgende Udbugning, ere skudte noget ud af den oprindelige Retning. Tab. II, Fig. 5, ligesom ogsaa Tab. III, Fig. 1 ere derimod tegnede efter Partier fra Kornets Rygside, hvor Cellevæggene beholde deres oprindelige, radiale Retning.

Tab. II, Fig. 9 viser et Tværsnit af Frugtknudevæggen, svarende til det nys skildrede Stadium af Frøhvidens Udvikling. Afbildningen fremstiller et Parti nær Furen; paa Ryggen ere Cellerne betydeligt mere sammentrykte. Frugtknudens Overhuds Celler ere mere tykvæggede end tidligere (sml. Tab. I, Fig. 8) og strakte meget i tangential Retning. Det farveløse Parenkym er betydeligt løsere, og Cellerne have ogsaa her forstørret sig en Del i tangential Retning under Kornets Tiltagen i Omfang. En Del af de indre Parenkymceller ere nu ganske sammentrykte; derimod ere de Bladgrønt førende Celler endnu grønne og med rigeligt Indhold; Figuren viser 3 Lag (sml. S. 108). Frugtknudens indre Epidermis samt Æggets ydre Hinde ere næsten forsvundne. Den indre Hindes to Lag Celler ere endnu meget tydelige; især det inderste Lags Celler ere meget større end tidligere. Ægkjærnen er ganske fortrængt, med Undtagelse af dens Overhud, hvis Celler ere voxede betydeligt og nu begynde at falde sammen. Desuden findes ud for Tilhæftningsstedet en lille Rest af Ægkjærnen. Umiddelbart indenfor Ægkjærnens Overhud ligge Frøhvidens stivelsefri Celler.

Ved Længdesnit iagttages, at samtlige Celler i Frugtknudevæggen og »Frøskallen« — med Undtagelse af de grønne — ere strakte overmaade stærkt i Retning af Frugtens Længdeaxe. I det farveløse Parenkym ligge Stivelsekornene samlede i den nederste Ende af Cellerne. De Bladgrønt førende Celler vise knap nogen Forøgelse i Diameter og ere kun hist og her løsnede lidt fra hverandre, af hvilken Grund jeg formoder, at de have delt sig. Dog iagttoges Deling ikke. Paa Grund af de talrige Parenkymcellers Forsvinden og de tilbage blivendes større Klarhed, viser hele Frugten sig langt stærkere grøn end i Begyndelsen af Udviklingen[1]). Avnerne ere nu begyndte at voxe sammen med selve Frugten.

---

[1]) Sml. hermed Nowackis Angivelser om Hveden. (Untersuchungen über das Reifen des Getreides. 1870. S. 23.)

Tab. II, Fig. 7 viser et svagt forstørret Længdesnit af hele Kornet, svarende nærmest til Fig. 8—10 og Tab. III, Fig. 7 b. Frugtknuden har dannet en lille nedad gaaende Udposning, hvori Kimens Rodende ligger. Kimen mangler meget i at være udviklet og skal endnu fortrænge en stor Del af Frøhviden. Dennes nederste, nærmest Kimmunden liggende Cellelag have under hele Udviklingen været stivelsefri. Disse Celler ere dog nu for længst fortrængte; de 3 à 4 Lag temmelig tømte, stivelsefri Celler, som nu ligge nærmest Kimen og ere begyndte at falde sammen, have tidligere indeholdt Stivelsekorn, ligesom de tilstødende, Stivelse førende Celler have haft større Rigdom paa dette Stof end nu.

Efter det beskrevne Stadium, i hvilket hele Kornet indeholder omtrent 70 % Vand og viser Frøhinden som en mælket, tykflydende Slim, foregaar vel endnu nogen Længdevæxt, men Kornet tiltager navnlig i Omfang, især paa Midten. Paa Grund af Furepartiets mindre energiske Væxt[1]) formes Frøhinden saaledes, at dens Tværsnit minder noget om en Hestesko. Ved den videre Tykkelsevæxt forandres efterhaanden Hesteskoformen til Nyreform (sml. Tab. III, Fig. 7 a—g).

Frøhvidecellernes Væxt foregaar samtidigt med og nøje knyttet til den fortsatte Udfyldning med Oplagsnæring, hvorved de paagjældende Celler udvides betydeligt. At der ved de yderste, stivelsefri Cellers Delinger, som ej vare afsluttede paa det sidst skildrede Stadium (Tab. II, Fig. 8), fremgaar andet end samme Slags Celler, synes usandsynligt. Maaske dannes dog nu og da et Lag smaa, tykvæggede Celler, rige paa Proteinstof, fedtfri og med faa og temmelig smaa Stivelsekorn.

Naar Kornet er omtrent 9 Mm. højt, indeholder c. 52 % Vand og paa Tværsnit viser sig som Fig. 7 e Tab. III, er Bladgrøntet i de paagjældende Celler af Frugtknudevæggen begyndt at forandres. Cellerne have et mere gulligt Indhold, undtagen paa begge Sider af Bugsømmen. Her holder den grønne Farve sig længst i de flere Celler mægtige Lag og bleges kun langsomt. Endnu i det ved Fig. 7 f. fremstillede Stadium, hvor Vandmængden udgjør omtrent 40 % af Kornets Vægt, sés til højre og til venstre for Bugsømmen olivengrønne Pletter.

---

[1]) Det blev allerede tidligere (S. 109 og 110) fremhævet, at Frøhviden i Bugsømmens Nærhed var videst fremme i sin Udvikling. Sandsynligvis standser af denne Grund Væxten tidligst her.

Det i anatomisk Henseende fuldt udviklede Korn har ikke længer noget Bladgrønt; Vandindholdet er da omtrent 30 à 35 %, og Frøhviden har en blød, voxagtig, men noget sej Konsistens. Fig. 7 g Tab. III fremstiller et Tværsnit af et saadant Korn; Furepartiet viser sig her som en fin Linie, der gaar ind til Midten af Frøhviden. Kornets Højde er nu omtrent 9 à 9,5 Mm.[1]). Dette Stadium betegnes almindeligt ved »Gulmodenheden«[2]). Alle Blade ere visne, Straaene gule eller gulrøde, med urent olivengrønne Knæ. Straaene ere som oftest ganske tørre i den øverste, Axet nærmeste Del. Stakkene ere ligeledes gule eller gulrøde. Frugtknudevæggen er meget sammentrykt og fastvoxet til de smukt gule Avner, som ofte endnu have et rødligt Skjær.

Fra dette Stadium voxer Kornet ikke mere, men synes at være fuldt udviklet. Stofvandring til Kornet maa være ophørt, Straaenes øverste Dele ere jo tørre. Der mangler endnu kun den fornødne Indtørring og Skrumpning, samt de dermed forbundne Processer, i at Kornet er ganske »færdigt«.

Anatomisk talt, kan det derfor siges, at der ikke sker nogen videre Forandring med Kornet efter »Gulmodenheden«; hvorvidt der foregaa kemiske Forandringer i Kornet efter dette Stadium, eller hvorvidt fysiologiske Ejendommeligheder udvikles[3]), ere Spørgsmaal af meget stor Interesse. Disse Spørgsmaal maa dog her forbigaas.

Det fuldt udviklede, lufttørre Bygkorn bestaar af Kimen, Frøhviden og Skallen. Denne sidste er, som bekjendt, sammensat af Frugt- og Frøskal, samt (med Undtagelse af de »nøgne« Bygsorter) tillige af de to Inderavner, der temmelig fast hæfte til Frugten. Tab. III, Fig. 3 viser et Tværsnit af Skallen, efter Behandling med Klorzinkopløsning (c. 60 %), hvorved de forskjellige Bestanddele blive noget tydeligere. Figuren svarer til Kornets Rygside. Ved Furen paa Kornets Bugside er Avnen ikke saa stærkt sammentrykt, som ellers overalt; ligeledes er den Frugtknuden tilhørende Del af Skallen her noget mindre presset og viser tydeligere de enkelte Cellelag.

---

[1]) Disse Maal ere kun omtrentlige Gjennemsnitstal; der findes mange modne Korn baade langt mindre og noget større. Denne Anmærkning gjælder de angivne Maal i det hele taget.

[2]) Sml. ogsaa Nowacki, paa det anførte Sted, S. 23.

[3]) Saadanne Processer menes vel med den i Praxis ofte anvendte Betegnelse »Eftermodning«.

Æggets Tilhæftningssted viser sig paa Tværsnit som et noget afrundet, mørkt brunfarvet Parti, hvor den nu alene tilbage værende indre Æghinde, ligeledes oftest brunfarvet, samt Ægkjærnens Overhud have deres Udspring (sml. S. 105). Fra Tilhæftningsstedet, der ved Længdesnit viser sig som en lang, mørk Stribe, »Pigmentstriben« (Tab. III, Fig. 2 e), udstraale ind imod Frøhviden nogle tomme, tildels sammenfaldne, strakte Celler, der ere at betragte som Rester af Ægkjærnen[1]). (Tab. III, Fig. 6 a og 6).

De to nævnte Figurer fremstille Furen eller en Del deraf, som den viser sig paa Tværsnit af det helt udviklede, »gulmodne« Korn (sml. Fig. 7 g) og af det lidt mindre udviklede, endnu grønne Korn (sml. Fig. 7 e—f). Fig 6 viser, at der i dette sidste mellem Ægkjærnens Rest og Frøhviden er et stort Hulrum[2]), som allerede opstaar paa langt tidligere Stadier. Dette Rum er i det friske Korn saftfyldt, det synes at indeholde en noget slimet, sukkerholdig Vædske. Det ses ogsaa, at Skallen og Resten af Ægkjærnen ikke gaa med Furen dybt ind i Kornet, saaledes som det er Tilfældet hos Rug og Hvede, men holdes næsten helt udenfor. Den smalle Stribe, som ved Tværsnit af det modne Korn ses at naa omtrent til Midten af Frøhviden, er altsaa blot Grænsen mellem de to hinanden mødende Dele af Frøhvidens indbøjede Bugside[3]). Langs

---

[1]) Sml. Holzner »Die Gerste« .. p. d. a. Sted, S. 199, Anm. 1 under Texten.

[2]) Nowacki (p. d. a. Sted S. 26) siger med Hensyn til Hveden: »Ofte løses, undertiden allerede før, hyppigere dog først samtidigt »med eller endog efter Bladgrøntets Forsvinden, Tilhæftningsstedet »(N. maa hermed mene Resten af Ægkjærnen) fra Frøhviden, og »der opstaar da mellem begge et paa langs gjennem Frugten »løbende Hulrum (Nowackis Fig. 9 ved l). Da hele Frøhvidens »Ernæring maa foregaa gjennem Tilhæftningsstedet, saa vilde, »med denne Løsnen fra Frøhviden, den Bro, ad hvilken Stofferne »udenfra naa ind, være afbrudt«. Denne Slutning er dog urigtig; Nowacki synes ganske at glemme Osmosens Betydning for Stofvandringen, samt overser, at Frøhviden aldrig har staaet i organisk Forbindelse med Ægkjærnens Rest og ej heller har haft noget »Tilhæftningssted«.

[3]) Denne Angivelse staar i Strid med Kudelkas (p. d. a. Sted, S. 11): »Ved Fuldmodenheden naar et smalt Parti af Fibrovasal»strængen« (hermed menes vel: Karstræng, Tilhæftningslinie og Rest af Ægkjærnen) »indtil Midten af Kornet, og stærkt fortykkede »Gluten»celler« omgive det«. — Holzner (p. d. a. Sted, S. 199) meddeler, at der ved fri Celledannelse skal opstaa nogle faa Celler i Rummet mellem Resten af Ægkjærnen og Frøhviden. Sligt har jeg aldrig set.

hele denne Grænse have de yderste Lag Frøhvideceller højst uregelmæssige, skjæve, sammentrykte Former, ere tykvæggede med kun lidet Indhold.

Kimen er i det foregaaende næsten ganske forbigaaet. De første Stadier af dens Udvikling har Nørner[1]) beskrevet for Hord. vulg's. Vedkommende og ledsaget Beskrivelsen med talrige, gode Figurer. Mine Iagttagelser over Kimen i dens forskjellige Stadier give ingen Anledning til Modsigelse, hvorfor her henvises til Nørners Afhandling, hvor videre Literatur findes angivet. Holzner (p. d. a. Sted S. 195), hvortil ligeledes henvises, skildrer kort den videre Udvikling, Dannelsen af de forskjellige Organer, og ledsager Texten med 7 skematiske Tegninger, gjengivende mediane Længdesnit af Kimen.

Naar hele Frugten endnu er ganske ung, voxer det lille Kimanlæg op i den bløde Frøhvide og omsluttes næsten ganske af denne. Idet Kimen efterhaanden under sin Væxt udsuger og fortrænger de nærmest liggende Celler (sml. S. 113), lægge disses Vægge, for saa vidt de ej blive opløste, sig tæt sammen og danne efterhaanden et temmelig tykt Lag, en Grænse mellem de Stivelse førende Frøhvideceller og Kimen. De yderste, stivelsefri Frøhvideceller gaa derimod, dog kun i et enkelt Lag, omkring den øverste Del af Kimen; de blive mindre og mindre nedefter og forsvinde tilsidst ganske. Tab. III, Fig. 2 er for lille til at dette Forhold tydeligt kan ses; hos Lintner: Lehrbuch d. Bierbrauerei, Braunschweig 1875, S. 25 & 31, findes to gode, større Afbildninger (Fig. 5 & 8), som ogsaa ere optagne i Holzners oftere anførte Afhandling (Fig. 24 & 27). Kudelka (p. d. a. Sted, S. 11) har den tilsvarende Angivelse.

Den skjoldformede Del af Kimen, som støder op til de sammenpressede, udsugede Frøhvideceller, er Kimbladet[2]). »Skjoldet« (scutellum), som under Spiringen bidrager til at opløse og opsuger Oplagsnæringen, udmærker sig ligesom hos andre Græsser ved ejendommelige, cylindriske Overhudsceller paa den mod Frøhviden vendte Side.

Af Rodanlæg findes 4—6, alle omsluttede af »Rodskeden« (coleorhiza), som ved Spiringen maa gjennembrydes. Kimknoppen er dannet af flere kræmmerhusagtigt hverandre omsluttende Blad-

---

[1]) Beitrag z. Embryoentwickelung der Gramineen. Flora. 1881, Nr. 16.

[2]) Sml. Warming: Forgreningen og Bladstillingen hos Slægten Nelumbo. »Videnskabelige Meddelelser fra Naturhistorisk Forening« for 1879 og 80. Anmærkningen under Texten S. 446—8.

anlæg. Kimen indeholder ingen Stivelse, men er derimod meget rig paa Fedt og Æggehvidestoffer.

Frøhviden indeholder som Oplagsnæring Kulhydrater, Proteinstoffer og Fedt. Af Kulhydrater kunne blot Stivelse og Cellestof findes ved mikroskopisk Undersøgelse; andre Kulhydrater[1]) forekomme dels ikke i saa stor en Mængde eller sammenhobede paa særlige Steder, at de kunne paavises mikrokemisk, dels have de ej karakteristiske Reaktioner, egnede til Udførelse under Mikroskopet.

Proteinstoffer findes over hele Frøhviden; i de Stivelse førende Celler udgjøre de Hovedmassen af det Netværk, hvori Stivelsekornene ere lejrede (se nedenfor). Dette Netværk er sværest i Cellerne henad Frøhvidens Omkreds og i dens øverste Del, betydelig tyndere i Cellerne dybere inde i Kornet. Deraf tør man slutte, at Proteinstofferne i det hele taget findes i størst Mængde i Frøhvidens øverste og perifere Celler.

Fedt findes i væsentlig Mængde kun i de tre yderste Lag Frøhvideceller, der ogsaa have stærkt fortykkede Vægge, hvis Cellestof for største Delen opløses under Spiringen, altsaa rimeligvis tjener som Oplagsnæring. De Fedt førende Celler indeholde ikke Stivelsekorn, hvilke derimod findes i alle øvrige Frøhvideceller.

Tab. III, Fig. 1 viser et Stykke af Frøhviden, et Tværsnit fra Kornets Rygside, lige over for Furen. Det tilsvarende Præparat blev fremstillet af et fast og haardt (»glasset«) Korn i tør Tilstand. Snittet lagdes i en tyndflydende Opløsning af Kanada-Balsam i Kloroform og er derfor kun udbolnet i ringe Grad. Cellevæggene vise sig af denne Grund temmelig tynde og ere noget forskrumpede; det hele Udseende svarer nogenlunde til den lufttørre Frøhvides Tilstand. Cellernes radiale Ordning træder tydeligt frem paa den afbildede Del af Kornet; som allerede ovenfor meddelt, blive Cellerne paa de fleste andre Steder trængte ud af deres oprindelige Retning. Længdesnit vise derimod næsten overalt meget smukt Frøhvidens radiale Struktur.

Øverst i Fig. 1 (o) ses de stivelsefri Celler; i en enkelt er der, foruden Cellekjærnen, indtegnet smaa runde Legemer, Proteinkorn. Disse Celler ere de saakaldte »Glutenceller«. Denne Betegnelse er urigtig og vildledende; thi »Gluten« findes ikke her. »Gluten« er et Produkt, som kun fremstilles af Hvedens Mel, i

---

[1]) Sml. Kjeldahl: Undersogelser over Kulhydrater i Byg og Malt; Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, 1ste Bd. 3die Hefte, S. 339.

Modsætning til vore andre almindelige Kornsorter, hos hvilke de paagjældende Celler dog i alt væsentligt stemme overens med Hvedens.

Hartig har givet Anledning til Forvirring, ved at give de af ham opdagede Proteinkorn Navnet »Klebermehl«. De omtalte Celler, som fandtes at indeholde »Klebermehl«, kunde da kaldes »Klebermehlzellen«; almindeligt kaldes de imidlertid »Kleberzellen«, hvoraf Navnet »Gluten celler« er en ligefrem Oversættelse. I nøje Forbindelse med denne uheldige Forkortning staar den hyppigt trufne Formodning, at »Gluten« findes i disse Celler hos Hveden. Dette er imidlertid ikke andet end en Begrebsforvexling. »Glutencellerne« vides ikke at have noget særligt med »Gluten« at gjøre[1]).

Hos Hvede og Rug findes kun én, hos Bygkornet tre Rækker stivelsefri Frøhvideceller. Paa Grænsen mellem Kimen og de Stivelse førende Frøhvideceller formindskes de dog til én Række (sml. S. 116). Langs den Spalte, som fra Furen gaar dybt ind i Frøhviden, ere disse Celler trængte meget ud af deres oprindelige Retning og ligge uden tydelig Orden. Tab. III, Fig. 4 viser Cellerne i et Tangentialsnit fra Ryggen af Kornet. Sete saaledes, have de ikke nogen regelmæssig Form eller Ordning, medens de paa Tværsnit, og ganske særligt paa Længdesnit, vise sig meget regelmæssige og radialt ordnede.

Med Hensyn til de nævnte Cellers Indhold findes der flere ældre og nyere Angivelser, af hvilke nogle maa anføres her. Hartig[2]) siger om Kornsorternes Frøhvide, at det yderste Cellelag uden Undtagelse kun indeholder finkornet »Klebermehl«, samt angiver tillige (p. d. a. Sted S. 121), at Kornsorternes Proteinkorn holde sig længere Tid uopløste i Vand, hvilken Omstændighed skal lette Iagttagelsen væsentligt.

S. L. Schenk[3]) har foretaget en speciel Undersøgelse af Hvedens stivelsefri Frøhvideceller og faar som Resultat, at der ikke findes nogen videre stor Mængde Proteinstof i disse Celler. Millons Reagens farver ikke Indholdet, medens derimod Celleslimen

---

[1]) Sml. ogsaa Meddelelser fra den botaniske Forening i Kjobenhavn Nr. 3. 1883 S. 31—33, Mødet d. 12/10 82. De sammesteds meddelte mikroskopiske Undersøgelser, som støttede sig til Paalideligheden af Pfeffers Hærdningsmaade, ere i nærværende Afhandling fuldstændiggjorte og berigtigede.

[2]) Entwickelung des Pflanzenkeims 1858.

[3]) Anatomisch-physiologische Untersuchungen. Wien. 1872 S. 32: »Ueber die Vertheilung des Klebers im Weizenkorne«.

(Netværket) i de Stivelse førende Frøhvideceller farves meget stærkt deraf. Paa Jodreaktionens Utilstrækkelighed til Paavisning af Æggehvidestoffer gjør Schenk med Rette opmærksom. De smaa, lysbrydende Korn, som findes i Cellerne, angives at være uopløselige i fortyndet Syre og i kunstig Fordøjelsesvædske; de kunne altsaa ikke bestaa af »Gluten« (Proteinstoffer). Paa forskjellige andre Stoffer reageres med negativt Resultat.

Mærkeligt nok er det særdeles rigelige Indhold af Fedt aldeles undgaaet Schenks Opmærksomhed, endskjøndt det er omtalt flere Steder i Litteraturen, saaledes bl. a. af Sachs[1]) og endnu tidligere af Payen samt af Trecul[2]).

Ved at betragte Snit af Bygkorn (aargammelt Alkoholmateriale af gulmodne Korn) i Vand, iagttog jeg i de omtalte Celler et meget tydeligt, protoplasmatisk Netværk eller System af Kamre. Da Schenk angiver, at de smaa, lysbrydende Korn vare uopløselige i de almindelige Opløsningsmidler for Æggehvidestoffer, laa den Antagelse nær, at Indholdet i Kamrene havde været Fedtkugler eller Draaber, som vare opløste af Alkoholen.

Betragtedes Snit af tør Frøhvide i Vand (Tab. III, Fig. 4 a), saas i de nævnte Celler, foruden større, olieagtige Draaber, ofte talrige, smaa, runde, stærkt lysbrydende Legemer af kun lidt varierende Størrelse. Det er disse Legemer, som i Regelen holdes for Proteinkorn. Da de farvedes brunsorte af Osmiumoversyre (1 %'s Opl.) og ikke hurtigt brunedes af Jodvand, viste de sig imidlertid at bestaa af Fedt eller Olie. Det er aabenbart disse Legemer, som Schenk har set og erklæret for ej at være af æggehvideartet Natur. Foruden Fedtkuglerne saas løsrevne Smaadele af et finmasket, protoplasmatisk Netværk, som undertiden indeholdt Fedt, undertiden derimod ikke farvedes af Osmiumsyre.

Ved at iagttage tørre Snit i Glycerin eller Jodglycerin kan man ikke afgjøre, om de smaa, lysbrydende Legemer, som da sés, ere Proteinkorn eller Fedtkugler, og da letopløselige Proteinkorn tidligere ere blevne forvexlede med Oliedraaber[3]), benyttedes Pfeffers Fremgangsmaade[4]), som angives at forhindre en saadan Fejltagelse. Forøvrigt angiver Hartig jo, at Græssernes Proteinkorn høre til de mest modstandsdygtige.

---

[1]) Botan. Zeitung, 1862 (sml. Figurforklaringen S. 150).

[2]) Compt. rend. T. 44. 1857. S. 449.

[3]) Sml. Sachs, Lehrbuch d. Botanik, 4te Aufl. 1874 S. 52.

[4]) Pfeffer: Untersuchungen über die Proteinkörper o. s. v. i Jahrbücher für wiss. Botanik, Bd. 8; S. 440—1, 445.

Tort fremstillede, tangentiale Snit (saaledes erholdes let større Flager, alene bestaaende af de nævnte Celler) af Byg-, Hvede- og Rugkorn forbleve nogle Dage i en 2 % 's Opløsning af Kvægsølvtveklor (Sublimat) i absolut Alkohol, efter hvilken Behandling selv de lettest opløselige Proteinkorn angives at blive uopløselige i Vand. Snittene udtoges af Alkoholen, bragtes, hvad Pfeffer tilraader, i Vand uden først at skylles med Alkohol, og betragtedes i Glycerin enten strax, eller efter Farvning med Jodvand eller Anilinblaat. Der saas da aldrig andet end et mere eller mindre regelmæssigt, plasmatisk Netværk, uden Korn (sml. Fig. 4 b).

Lagdes Snittene paany i absolut Alkohol, derpaa i Æther, og tørredes de nu, tilsidst ved svag, kunstig Varme, saa kunde man, ved at bringe dem under tykflydende Glycerin og med Naalen fjerne de Luftblærer, som dannes over Præparaterne, iagttage smaa, runde, sort udseende Luftblærer i de talrige Kamre (sml. Fig. 4 c), som altsaa maa have været tomme. Herefter var det da højst sandsynligt, at der i de stivelsefri Celler ikke fandtes Proteinkorn, men derimod Fedtkugler, lejrede i et Netværk af Protoplasma.

Ved at forberede Snit af tørre Bygkorn til at indlægges i Kanadabalsam, bemærkedes imidlertid, at de smaa, lysbrydende Korn ikke opløstes af Kloroform. Tørt fremstillede Snit, som i nogen Tid laa i Kloroform eller Benzol (Kultjærebenzin $C_6 H_6$), viste, nedlagte i Kanadabalsam, meget tydelige Korn (Fig. 4, d), som vare lejrede i et noget svagt Netværk. At det ikke var Hulrum, saas ved at udvaske Snittene med Kloroform eller Benzol, tørre dem[1]) og lægge dem under Glycerin eller tykflydende Kanadabalsam. Der fandtes da kun uregelmæssige, luftfyldte Sprækker mellem de smaa Korn, rimeligvis opstaaede ved Forskrumpning af det paa Grund af Fedtets Fjernelse temmelig stoffattige Netværk. Da disse Korn ikke kunne være Fedtkugler og ej heller ere Stivelse, ere de utvivlsomt Proteinkorn.

Hartigs og Schenks Angivelser, at de iagttagne smaa Legemer ere uopløselige i eller modstandsdygtige mod Vand o. s. v., gjælde derfor ikke Proteinkornene, men de smaa Fedtdraaber, som maa udskilles af Netværkets Masse ved Svulmningen i Vand. Proteinkornene hos Kornsorterne paavirkes derimod, trods Sublimatalkoholens Indvirkning, meget stærkt af Vand og give, idet

[1]) Denne Tørring maa foretages i et tørt, varmt Værelse eller i en svagt opvarmet Tørreovn: ellers kan der let paa Præparatet fortættes en ikke ubetydelig Mængde Vand, som kan indvirke forandrende paa Objektet.

de blære sig op, Celleindholdet Udseende af et Netværk, hvis Hulrum ere de i Proteinkornene dannede, store Vakuoler, og hvis Vægge ere dannede ved Sammensmeltning af Proteinkornenes yderste Lag med den for Fedtet befriede Mellemmasse[1]. Sublimatalkoholen viser sin Virkning, foruden ved at fjerne Fedtet, ogsaa derved, at Celleindholdets Destruktion ikke gaar videre end skildret, medens Indholdet hos ikke hærdede Snit meget utydeliggjøres ved Vandets Indflydelse, samtidigt med de smaa Fedtdraabers Udtrædelse.

Det ses nu tillige, at Pfeffers Fremgangsmaade ikke byder nogen ubetinget Garanti. Faktisk har Troen paa denne Hærdningsmethodes Sikkerhed ført mig til Forvexling af Proteinkorn med Fedtdraaber, skjøndt Methoden netop blev udtænkt for, hvad den i de fleste Tilfælde vel ogsaa kan, at hindre en slig Fejltagelse. Det har forøvrigt vist sig, at Præparater af Hasselnød og enkelte andre Frø, som have lidet modstandsdygtige Proteinkorn, efter Behandling paa den omtalte Maade viste større eller mindre Vacuoler i Proteinkornene.

Det er ej heller ganske rigtigt, at Sublimatalkohol altid gjør Æggehvidestoffer uopløselige[2]; er Æggehviden tør, kan Reagenset ikke paavirke andet end det alleryderste, tynde Lag[3]. Lufttørret, middelfint pulveriseret Hønseæggehvide blev saaledes ved længere Tids — flere Ugers — Henstand med Sublimatalkohol og derpaa følgende Afskylning med Vand, ikke gjort uopløselig; Smaastykkerne bolnede særdeles stærkt ud og afgave betydelige Mængder Stof til Vand.

Hvorvel man ikke uden videre kan overføre et saadant Resultat paa de organiserede, mikroskopiske, ikke Vand taalende Proteinkorn, kan det dog tjene som en Paamindelse om, ikke at stole for sikkert paa de Methoder, som skulle fixere Objekternes finere Struktur, i alt Fald ikke, naar de anvendes paa tørre Gjenstande.

Med Hensyn til den kemiske Undersøgelse træder Upaalideligheden af mange mikrokemiske Reaktioner stærkt frem som et svagt Punkt i den botaniske Mikroskopi. I denne Sammenhæng have Fedt og Proteinstofferne særlig Interesse, hvorfor nogle al-

---

[1]) Tangl: Das Protoplasma der Erbse. 1ste Abhandlung, Sitz.-Ber. d. Wiener Acad. 1877, Særtryk S. 56, skildrer en lignende Proces hos Ærtens Proteinkorn, naar de behandles med Glycerin.

[2]) Poulsen p. d. a. Sted S. 51.

[3]) En Antydning heraf findes hos Pfeffer p. d. a. Sted, S. 445; ved Angivelsen om kortvarig Indvirkning af Sublimatalkohol paa Proteinkornene hos Pæonia.

mindeligt anvendte mikrokemiske Kjendetegn i al Korthed skulle omtales.

At Fedtstofferne i det hele taget ere stedmoderligt behandlede i Litteraturen, fremgaar af den Omstændighed, at baade Poulsen i de forskjellige Udgaver af sin bekjendte Mikrokemi, og Behrens i sin iaar udkomne, større Bog[1]), endskjøndt der begge Steder er taget Hensyn til en udstrakt Litteratur, kun offre disse Stoffer en meget ringe Plads og flygtig Omtale[2]).

I de to Mikrokemier angives flere Reaktioner paa Proteinstoffer, af hvilke nogle imidlertid lige saa godt passe paa Fedtstoffer (og andre). Saaledes optager Fedt eller Olie, som bekjendt, mange Farvestoffer — de fleste Anilinfarver næsten lige saa hurtigt, som Proteinstoffer optage dem, Eosin og andre derimod noget langsommere. Jod optages ligeledes, med stigende Hastighed eftersom den anvendte Opløsning indeholder større procentisk Alkoholmængde[3]); dog farves Proteinstofferne som Regel meget hurtigere. Stærk Salpetersyre giver, med eller uden efterfølgende Behandling med Ammoniak, en brun eller gul Farve med Fedt saa vel som ogsaa med andre Stoffer. Derimod farves Fedt ikke ved Millons Reagens og heller ikke af Karminopløsninger. At Millons Reagens er aldeles upaalideligt og farver flere, ikke æggehvideartede Stoffer, er bekjendt nok; her kan blot anføres, at Kornsorternes Avner farves intensivt røde eller rødbrune. Nærværelse af Fedt hindrer Millons Reagens meget i at paavirke Proteinstofferne; stærkt fedtholdigt Plasma farves neppe deraf. Karminfarvningen besværliggjøres eller hindres ligeledes af Fedt. Forinden man reagerer paa Proteinstoffer, bør Fedtet saa vidt muligt altid fjernes fra Præparaterne, f. Ex. ved Benzol. Karminet, anvendt i en meget fortyndet Opløsning, ligesom ogsaa Svovlsyre og Sukker turde have særlig Betydning som Æggehvidereagenser, dog kun naar de andre Midler ogsaa give positive Resultater. Hvor fristende det end er,

---

[1]) Behrens: Hilfsbuch z. Ausführung mikroskopischer Untersuchungen. 1883.

[2]) Behrens begaar den mærkelige Fejl (S. 374), at inddele de i Planterne forekommende Fedtstoffer paa følgende, kategoriske Maade: »enten ere de flydende (fede Olier), eller de ere faste Legemer (Vox)«. Der nævnes ikke fast Fedt, som dog hyppigt forekommer, f. Ex. i krystallinsk Form hos Paranodden. (Sml. Pfeffer p. d. a. Sted. Tab. 36, Fig. 16).

[3]) Heri maa vistnok Forklaringen søges til Sachs's og Pfeffers Iagttagelser m. fl. til Farvningen af Proteinkornene og Grundmassen i Lupinfrø ved Behandling med Jod, opløst i stærkere eller svagere Alkohol. (Sml. Pfeffer p. d. a. Sted, S. 437).

at gaa nærmere ind paa disse Spørgsmaal, maa jeg dog nu vende tilbage til denne Meddelelses egentlige Æmne.

De tre yderste Lag Frøhvideceller hos Bygkornet indeholde altsaa lidet modstandsdygtige Proteinkorn, lejrede i en meget fedtrig Grundmasse. Cellekjærnerne ere særdeles tydelige. Væggene ere tykke og indeholde som Oplagsnæring en ikke ringe Mængde Cellestof. Det samme gjælder for Hvedens[1]) og Rugens et Lag mægtige, stivelsefri Frøhvideceller.

Indenfor de nævnte Celler ligge de Stivelse førende Frøhvideceller, af hvilke de yderste ere betydeligt mindre end de dybere liggende og have tykkere Vægge. Stivelsekornene ere lejrede i en meget svagt grynet Protoplasmamasse, der paa tynde Snit viser sig som et Netværk; særlige Kapsler omkring Stivelsekornene har jeg ikke kunnet finde. Egentlige Proteinkorn kunne ikke iagttages her, Grynene ere vel for utydelige til denne Betegnelse[2]).

Stivelsekornene i de henad Omkredsen og mod Kornets Spids liggende Celler ere langt færre i Antal end dybere inde i Frøhviden; de ere, som det ses paa Tab. III, Fig. 1, omtrent lige store og meget mindre end de indre Cellers store Korn. Jo længere ind imod Midtpartierne af Frøhviden, desto rigeligere findes Stivelse i Cellerne, og desto større blive Kornene; først fra det

---

[1]) I det ifjor udkomne Værk af Emerich Pekár: »Weizen und Mehl unserer Erde«, Budapest 1882, som vistnok har stor Betydning m. H. til Hvedeundersøgelser i praktisk Øjemed, findes der S. 4–13 en anatomisk-fysiologisk Beskrivelse af færdige Hvedekorn, ledsaget af en Tavle Figurer.

Denne Beskrivelse er i sin Helhed noget forfejlet, hvad det er saa meget vigtigere at gjøre opmærksom paa, som Forfatteren (sml. Fortalen) søger »at give et videnskabeligt korrekt Billede af Hvedekornets Struktur«. Ved Undersøgelsen kan der næppe være taget videre Hensyn til Udviklingshistorien eller til den nyere Litteratur; thi det stivelsefri Lag af Frøhviden betegnes »Keimhülle (Membrana embryonalis, Albumen, Perisperm)« og der angives, at dette Lag omgiver hele Frøhviden og kun lader en Side af Kimen fri, hvor det dog skal hænge sammen med »Skjoldet«, der skal have fuldstændig lignende Beskaffenhed som det nævnte Lag Celler. Dette Lag »danner saa at sige »Skjoldets« Fortsættelse«, angiver Pekár; fremdeles holder denne Forfatter sig til Mege-Mouriès ganske forældede Undersøgelser m. H. til disse Cellers Indhold. Der tilskrives de nævnte Celler nogle højst mærkelige fysiologiske Egenskaber, hvilke Angivelser her ikke nærmere skulle kritiseres; kun maa jeg gjentage, at Hvedens Fedt førende Frøhvideceller m. H. til Indhold vise den største Overensstemmelse med Byggens. Blandt Pekárs Afbildninger lide flere af væsentlige Mangler.

[2]) Sml. Pfeffer p. d. a. Sted, S. 489.

andet eller tredie Lag optræde i væsentlig Mængde de ganske smaa Stivelsekorn, der, indlejrede paa samme Maade som de store, findes mellem disse[1]).

Det proteinrige Netværk i Cellerne bliver tyndere og tyndere indad mod Frøhvidens Midte, men det mangler ingensteds. Paa tørt fremstillede, tynde Snit af de hornagtige, saakaldte »glassede« Korn, hvis Celleindhold ikke saa let sønderrives, ses det meget tydeligt, naar Snittet lægges i Kanadabalsam (en ikke for tykflydende Opløsning). Da Stivelsekornene nemlig have meget nær samme lysbrydende Evne som Balsamen, ses de ikke, men vise en skuffende Lighed med større og mindre Hulrum i den proteinrige Grundmasse, Celleslimen.

Hos Korn, i hvis Frøhvideceller der findes talrige Luftblærer (»melede« Korn), og hvis Celleindhold meget let sønderrives, har man undertiden ment, at det protoplasmatiske Netværk manglede, navnlig i de indre Celler (se nedenfor). Dette er dog ikke Tilfældet. Udblødes Kornene én eller bedre et Par Dage med Vand, saa kunne de bag efter hærdes med Alkohol efter Strasburgers Maade (sml. S. 104) Fremstilles nu tynde, men paa Grund af Glycerin-Alkoholens Indvirkning hele Snit, saa ville, hvad enten der anvendes »melede« eller »glassede« Korn, Farvemidler let kunne tydeliggjøre Netværket, især naar man, efter at have vasket det farvede Snit med Vand, Alkohol, Æther og Kloroform, lægger det i Kanadabalsam. Det synes for øvrigt, at Netværkets Masse i de længst fra Omkredsen liggende Celler ikke saa begjærligt optager Farvestof, som de ydre Cellers. Om man maaske blot skuffes af det svagere Nets ringe Masse, maa jeg lade staa uafgjort; jeg troer imidlertid, at der virkelig er en Forskjel tilstede.

Netværket kan ogsaa gjøres meget tydeligt paa følgende Maade. Snittet (dersom det er fremstillet af Alkoholmateriale, da efter Udvaskning med Vand) behandles paa Objektglasset i 15 til 30 Minuter med fortyndet Salpetersyre (15 à 25 %), hvortil der er sat nogle Draaber »Skedevandsbejtse«[2]). Efter at Præparatet,

---

[1]) Egnene omkring den Spalte eller Fold, som gaar ind til Frøhvidens Midte (sml. S. 115), høre jo til Frøhvidens oprindelige Omkreds; Stivelsekornene have ogsaa her kun Mellemstørrelse eller ere endog mindre. Netværket er her ganske vist stærkt, dog ikke nær saa svært som i de andre, nær Omkredsen liggende, mindre fortrykte, Stivelse førende Celler.

[2]) Denne Vædske faas i Handelen; ogsaa kaldet Aloebejtse. Fremstilles ved at opvarme Aloe med fortyndet Salpetersyre, indtil stærk Brusning indtræder, og derpaa at fortynde med Vand.

stadigt liggende paa Objektglasset, forsigtigt er vasket med Vand, tilsættes Glycerin, og Dækglasset paalægges. Særdeles tydelige Demonstrationsobjekter, der vise Netværket med en smuk, brunlig Farve, kunne saaledes opnaas. Da Snittene bulne stærkt ud ved denne Behandling, bør man undgaa for store Præparater; thi de krølles let.

Tab. III, Fig. 5 viser det omtalte Netværk i et Par af de ydre Stivelse førende Frøhvideceller fra Siden af Kornet, behandlede med en frisk Opløsning af Klorzink, Karmin og Eddikesyre[1]). Fig. 8 viser en Del af Netværket i en dybere liggende Celle, hvor der mellem Rummene til de store Stivelsekorn ligge talrige smaa. Disse Figurer ere tegnede efter samme Præparat af et tørt, halvmelet Korn. Cellekjærnerne hos de Stivelse førende Celler ere ganske sammenfaldne; de sés ikke tydeligt.

I Byggens Frøhvide findes, saavidt mine Iagttagelser gaa, ingen Mellemcellerum. Alle Frøhvidens Vægge danne ét hele; løse Celler findes ikke. De Afbildninger, paa hvilke de enkelte Frøhvideceller hos Rug, Byg og Hvede ere tegnede med deres egne, særlige Vægge, trænge til Korrektion. Saaledes er det urigtigt, naar Kudelka (p. d. a. Sted Fig. 17 o. fl.) lader de stivelsefri Cellers Vægge fremtræde som et hele for sig, skarpt afgrænset mod de (ikke afbildede) indre Frøhvideceller. Grønlund har i sine flere Steder optagne Afbildninger[2]) lignende Fejl, som forøvrigt findes hos forskjellige ældre og nyere Forfattere, f. Ex. Payen, Tietschert, Nowacki, Pekár o. fl. De anførte Billeder fra Lintners Bog (tegnede af Hermann) have derimod ikke denne Mangel, lige saa lidt som Rützous Originaltegning hos Warming, Almindelig Botanik, S. 62.

De lufttørre Byg- og Hvedekorn kaldes »melede«, naar de ere bløde og ved at gjennemskjæres vise en snehvid, fløjelsagtigt skinnende Frøhvide, som er meget porøs og let sønderrives; de kaldes »glassede« (»hornagtige«, »flintede«), naar Frøhviden er haard, fast, gjennemskinnelig, og viser en mere eller mindre mørk (graa, brunlig, rødlig) Snitflade. Imellem disse to udprægede

---

[1]) Denne Fremgangsmaade, ved hvilken der opnaaedes nogle smukke Præparater, er dog paa Grund af dens Omstændelighed upraktisk; den omtales kun for Figurforklaringens Nøjagtigheds Skyld.

[2]) Til Afhandlingen: »Bidrag til Oplysning om Græsfrugtens Bygning hos forskjellige Slægter og Arter«. Botanisk Tidsskrift. 3die Række, 1ste Bd. S. 140.

Typer findes jævne Overgange, hvorfor det ofte er vanskeligt at afgjøre, om et Korn er mere »melet« end »glasset«. Maaden, hvorpaa de melede Partier ere fordelte i delvis glassede Korn, kan være forskjellig; hyppigst ere Kornenes indre Dele melede, medens de ud imod Omkredsen liggende Dele ere glassede.

I denne Meddelelse skulle kun de mikroskopiske Undersøgelser af de to forskjellige Slags Korn omtales. Nowacki[1]) angiver, at Frøhviden hos melet Hvede indeholder Luft mellem Stivelsekornene, medens der i glasset Hvede ikke findes Luftrum. Det hedder: »betragter man temmelig tynde Snit i Olie eller Glycerin »under Mikroskopet, saa sér man i de paagjældende Frøhvideceller »mellem Stivelsekornene i det melede Korn en Mængde smaa, »uregelmæssigt kantede, mørke Pletter — indesluttede Luftblærer, »medens der mellem det glassede Korns Stivelsekorn ikke kan »iagttages saadanne Pletter«.

Grønlund[2]) har fundet dette stadfæstet hos Bygkornene, »de mange smaa Luftrum gjøre da Kornet uigjennemsigtigt . . .«. Denne Forfatter fæster imidlertid Opmærksomheden paa Proteinstoffernes Forekomst i de to Slags Korn og tager ikke videre Hensyn til de luftfyldte Mellemrum.

Samsøe Lund[3]) angiver i Modsætning til Grønlund, at Luftblærerne i Byggens Frøhvide ligge mellem Cellernes Vægge og deres Indhold, samt at der ogsaa i glasset Korn findes nogen Luft. Der skrives (p. d. anf. Sted S. 448, Særtryk S. 9): »at melede »Korn indeholde en langt betydeligere Mængde af Luft, her siges »udtrykkelig Mængde af Luft; thi der findes ikke noget Korn »saa glasset, uden at det jo dog indeholder nogen Luft«.

At Samsøe Lund kommer til dette sidste Resultat, er en Følge af den anvendte Fremgangsmaade ved Præpareringen af Snittene. At Nowacki og Grønlund ikke ogsaa fandt Luftrum i glasset Frøhvide, synes at bero paa Tilfældigheder, maaske have Iagttagelserne ikke været talrige, da de ellers vistnok havde ført til en lignende Anskuelse som Samsøe Lunds. Grønlund har imidlertid i sin senere Afhandling[4]) optaget dennes Angivelser,

---

[1]) Paa det anførte Sted, S. 58. Haberlandts Undersøgelser over Hvede, der ogsaa tage Hensyn til Forskjelligheder mellem melede og glassede Korn og skulle findes i »Landw. Centralblatt for Deutschland v. Krocker u. Wilda, 1866«, har det været mig umuligt at faa Adgang til.

[2]) Om Melbyg og Glasbyg, S. 15.

[3]) Glasbyg og Melbyg. »Tidsskrift f. Landøkonomi« 1881. S. 442.

[4]) I Tidsskrift f. Landøkonomi 1882.

ja er endog gaaet meget videre, idet der (S. 697, Særtryk S. 44, sml. ogsaa S. 687, Særtryk S. 34) udtales, at det ofte vil bero paa et Skjøn, om man finder mere Luft i det ene eller det andet Slags Korn.

Denne Fejltagelse har sin væsentlige Grund i dette Forhold: ved at fremstille Snit af glassede Korn paa almindelig Maade, føres under selve Præpareringen næsten altid Luft ind i Objekterne. Middeltynde, tørt fremstillede Snit af saadanne Korn blive næsten altid hvide, uigjennemsigtige og have altsaa tabt det karakteristisk glasagtige. Snittene knækkes nemlig under Fremstillingen, og derved slipper Luft ind i de opstaaede Sprækker, ganske som naar Glas knuses. Det har nu vist sig, at disse fine Spalter særligt følge Cellevæggene, navnlig ved Længdesnit; og Præparater, fremstillede af det mest »typisk« glassede Materiale, vise da oftest Luftrum langs Væggene.

Den almindeligt anvendte Præparationsmethode giver saaledes ingen Garanti; derimod opnaas det paa følgende Maade at undgaa den nævnte Fejl. Kornet skjæres over, og Snitfladen glattes omhyggeligt ved Hjælp af Barberkniven. Derpaa trykkes Kornet, med Snitfladen nedad, i en meget tykflydende og sej Blanding af Kanadabalsam og Kloroform, idet man passer paa, at ingen Luftblære kommer ind mellem Snitfladen og Balsamen. Dette er uden Vanskelighed. — Balsamen har man anbragt enten direkte paa et Objektglas eller, hvad der er bedre, paa et ikke for lille Dækglas, som for Fasthedens Skyld er klæbet til en lille Glasplade ved Hjælp af lidt arabisk Gummi.

Efter at det hele nu har henligget tilstrækkeligt længe til at Balsamen er bleven fast, kan man med en lille Fil eller Kniv bortraspe saa meget af Kornet, at en Plade af ønsket Tykkelse bliver tilbage, og derpaa med Barberkniven glatte Overfladen. Det saaledes fremstillede Præparat dækkes med tykflydende Balsam, og der paalægges nu Dæk- eller Objektglas. Efter kortere Tids Tørring kan det hele — om fornødent — lægges i Vand, for at Gummien mellem Dækglas og den tilklæbede Glasplade kan opløses. Da den først fremstillede Snitflade i Regelen vil være den glatteste og mest jævne, ere de Præparater, hvor denne Flade vender mod Dækglasset, de smukkeste.

Ved den skildrede Fremgangsmaade, nærmest en Slibning, faar man af rent glassede Korn fuldstændigt gjennemskinnelige Plader, der ikke indeholde Luftrum, medens saadanne findes i stor Mængde i melede Frøhvideceller. Det kan derfor siges, at rent glassede Frøhvideceller ikke indeholde

Luftrum; findes saadanne, da er Kornet ikke rent glasset, men nærmer sig i samme Grad, som Luftmængden stiger, til det rent melede.

Med Hensyn til Luftrummenes Plads i de melede Frøhvideceller bleve to forskjellige Anskuelser allerede nævnte. Medens Nowacki for Hvedens, og Grønlund for Byggens Vedkommende mene, at Luftblærerne findes »mellem Stivelsekornene«, paastaar Samsøe Lund, at de ligge mellem Cellevæg og Celleindhold. En Del af Luftrummene findes vistnok ved, eller ikke langt fra Cellevæggene, men jeg har dog nogle Gange sikkert kunnet paavise Luftblærer dybere inde i Cellen. Har man ved »øverste Indstilling« af Mikroskopet nogle Stivelsekorn, under disse en Luftblære, og ved endnu dybere Indstilling atter Stivelsekorn, da maa Luften have været dybere inde i Cellen. Paa Grund af de paagjældende Objekters Uigjennemsigtighed lykkes det imidlertid sjældent at se slige Luftblærer med tilstrækkelig Tydelighed.

At Luften ikke almindelig findes som ganske smaa Blærer, har Samsøe Lund allerede paavist; af den Omstændighed, at der ikke ses Luftblærer, naar temmelig tynde Snit af melede Korn lægges i Glycerin, tør man dog ikke slutte, at der ej findes Luftrum i Celleindholdet; thi Luftblærerne kunne jo maaske ofte staa i Forbindelse med hverandre. Dersom Luftrummene alene fandtes mellem Cellevæg og Celleindhold, maatte man undre sig over den Lethed, hvormed netop Indholdet af de melede Frøhvideceller falder hen i Smaadele. Dette sidste Forhold tyder paa en temmelig jævn Fordeling af Luftrummene over hele Celleindholdet.

Foruden de Luftrum, som ere karakteristiske for melede Frøhvideceller, findes ikke sjældent Revner eller Spalter tværs igjennem Frøhviden, især hos glassede Korn. Disse Revner, som let kjendes fra melede Cellers Luftrum, ere sandsynligvis opstaaede ved Afgrødens Behandling (Tærskning, Kørning), dog er det ikke udelukket, at saadanne Spalter kunne opstaa under Kornenes Skrumpning. Mellem Skallens Lag, mellem Skal og Kjærne samt undertiden midt i Kornet findes luftfyldte Hulrum, der variere meget i Størrelse og gjøre Vægtfyldebestemmelser upaalidelige, i alt Fald naar de anstilles for at drage Slutninger angaaende Luftmængden i Frøhvidens Celler.

Den Ejendommelighed, som betinger et Korns melede Udseende, er altsaa Forekomsten af luftfyldte Mellemrum i Frøhvidecellerne. Foruden denne Ejendommelighed har man ogsaa søgt andre anatomiske Forskjelligheder imellem de to Slags Korn.

Nowackis[1]) Iagttagelser gave ham den Forestilling, at Stivelsekornene hos melede Hvedekorn ligesom ere voxede ud af Celleslimen (»Netværket«, se ovenfor) og ligge frit, løse i Cellerne. Grønlund[2]) førtes i Overensstemmelse hermed til den Anskuelse, at et særligt kvælstofholdigt Stof (d. v. s. Celleslimen) omgav Stivelsekornene i glassede Bygkorns Frøhvideceller, medens det manglede, eller næsten manglede hos melede Korn, som i Stedet for det nævnte Stof førte Luft. Denne Antagelse blev tilbagevist af Samsoe Lund[3]), som fandt, at Celleslimen baade i melede og glassede Frøhvideceller omslutter Stivelsekornene, samt at Celleslimens Strænge (»Netværket«, sml. Tab. III, Fig. 5 og 8) ere særligt stærke i Cellerne ud imod Kornets Omkreds, svagere ind imod dets Midte. Dette stemmer ganske med mine Iagttagelser (se Side 124) saavel hos Byg, som hos Hvede. Ved Præparaternes Fremstilling maa Nowacki og Grønlund vistnok have beskadiget Netværket i de melede Frøhvideceller.

Holzner[4]) angiver, at »gjentagne mikroskopiske Undersøgelser »overbeviste ham om, at i glasset Byg var Antallet af de store Stivelse- »korn forholdsvis meget ringere end i normal (d. v. s. melet) Byg«. Der siges i den korte Bemærkning ikke, at det nævnte Forhold skal være Grund til det glassede Udseende; men en saadan Betydning tillægges dog Holzners Ord i Thausings ansete Lærebog[5]). Der siges nemlig, under Henvisning til Holzner: »medens »man tidligere antog, at Aarsagen til, at Byg er glasset, skulde »søges i et betydeligt Indhold af Gluten (her maa menes »Protein- »stof«), hvilken Anskuelse synes gjendreven derved, at stor Glasset- »hed aldeles ikke behøver at falde sammen med højt Proteinindhold, »og at melet Byg ikke altid behøver at være stivelserig (Schultze), »antager man nu, at Glassetheden er betinget ved Nærværelsen af »store Mængder smaa Stivelsekorn«. Til Forekomst eller Mangel af Luftrum tages i Thausings Bog slet ikke Hensyn.

Den nævnte Anskuelse er ikke rigtig. I de yderste, mest glassede Celler hos halvt melede Korn findes ingen eller kun faa ganske smaa Stivelsekorn; jo længere ind mod Kornets Midte, altsaa ind mod de mest melede Egne, jo flere af de ganske smaa Stivelsekorn findes der

---

[1]) Paa det anførte Sted, Side 77.
[2]) Om Melbyg og Glasbyg, Side 14—15.
[3]) Paa det anførte Sted, Side 442—444, Særtryk, S. 3—5.
[4]) I »Zeitschrift f. d. gesammte Brauwesen« 1878, Side 276, Anm. under Texten.
[5]) Thausing: Die Theorie u. Praxis d. Malzbereitung u. Bierfabrikation. 2te Auflage, Leipzig, 1882, Side 186.

mellem de store. Desuden kan Frøhviden jo slet ikke vise sig »melet«, hvilken Størrelse Stivelsekornene end maatte have, naar der ikke findes luftfyldte Mellemrum i Cellerne. Og endelig kan der med Hensyn til Stivelsekornene slet ikke sés nogen Forandring, naar glassede Korn ved Udblødning og paafølgende Tørring ere blevne melede; ligesom ogsaa »Netværket« synes uforandret, bortsét fra de dannede Luftrum. Grønlund har forøvrigt i sin første Afhandling (S. 13) paavist Urigtigheden af en Anskuelse som den i Thausings Bog fremsatte.

Imidlertid synes det, saavidt det kan siges uden omhyggelige og talrige Tællinger, som vanskeligt her lade sig udføre med Sikkerhed, at, naar ensliggende Dele[1]) af Frøhviderne sammenlignes, de glassede Korn have en noget større Mængde smaa Stivelsekorn, end de melede af samme Afgrøde. Der kan imidlertid indenfor en rent glasset Afgrøde være lignende Forskjelligheder. Paa samme Maade forholder det sig med Hensyn til Mægtigheden af det protoplasmatiske Netværk, hvori Stivelsekornene altid ere lejrede.

At »Skallens« Farve og Skjær for en stor Del er betinget af det gjennemsigtige glassede, eller uigjennemsigtige melede Indre, er indlysende. En Demonstration heraf faas ved med lette Hammerslag at banke et glasset Korn, saa at det knuses indvendigt; Kornets Farveskjær forandres strax. I sig selv meget hvide Avner ledsage ofte Glassethed. At »Skallens« Tykkelse ikke staar i noget bestemt Forhold til Frøhvidens glassede eller melede Karakter, har Grønlund godtgjort ved en Række Maalinger[2]), hvis Resultater stemme fuldstændigt med mine Iagttagelser.

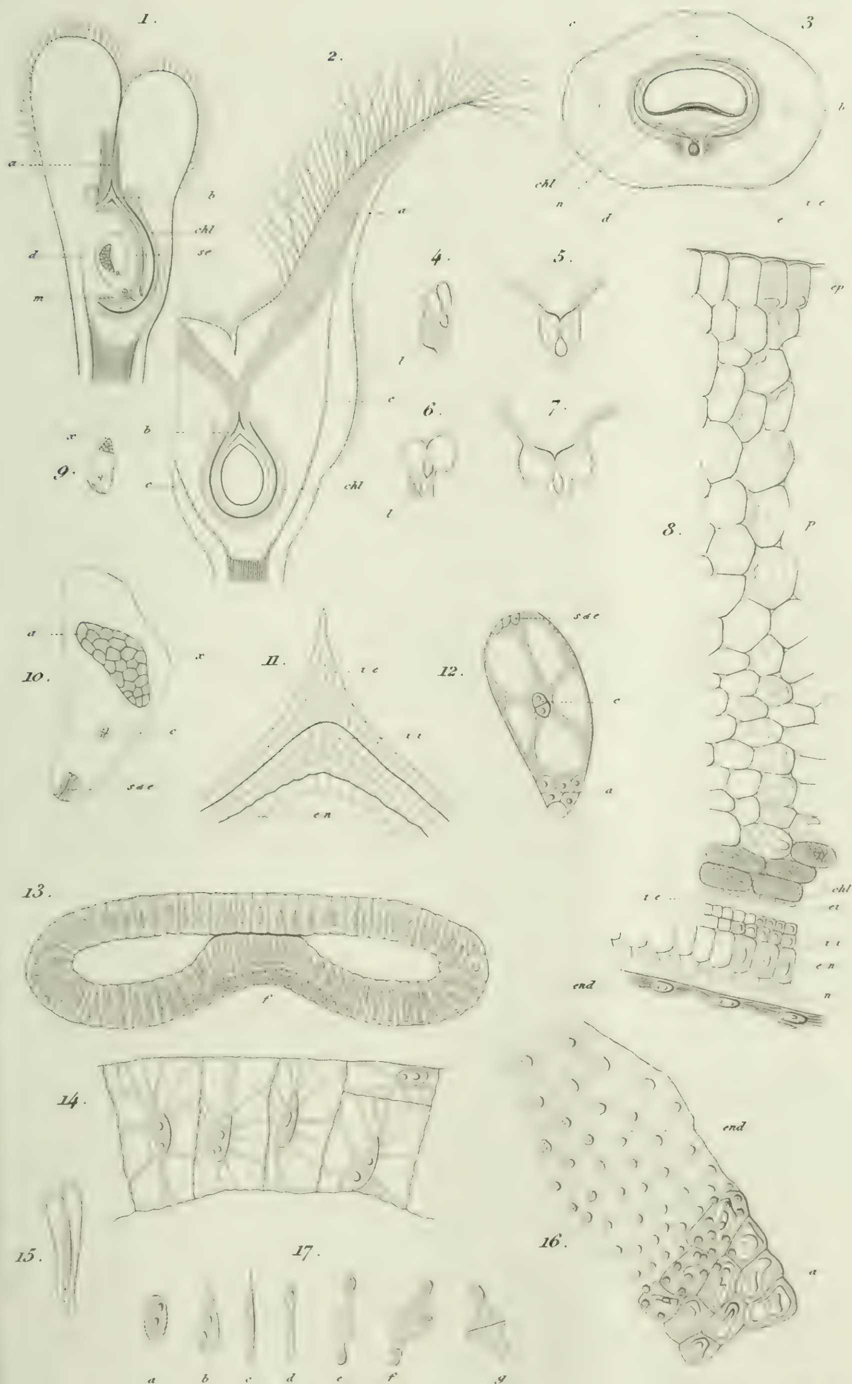
Med Hensyn til Kornenes Form og Størrelse synes der ikke at være nogen Konstans, der kan benyttes til at drage Slutninger. Indenfor samme Afgrøde ville de glassede Korn hyppigst tillige være de længste og mindst smukke.

---

[1]) Ved sammenlignende mikroskopisk Undersøgelse af Korn maa altid »ensliggende« Dele sammenholdes. Vilde man f. Ex. sammenligne de mest »typisk glassede« ydre med de mest »typisk melede« indre Egne af Frøhvider, da vilde man faa et aldeles urigtigt Resultat.

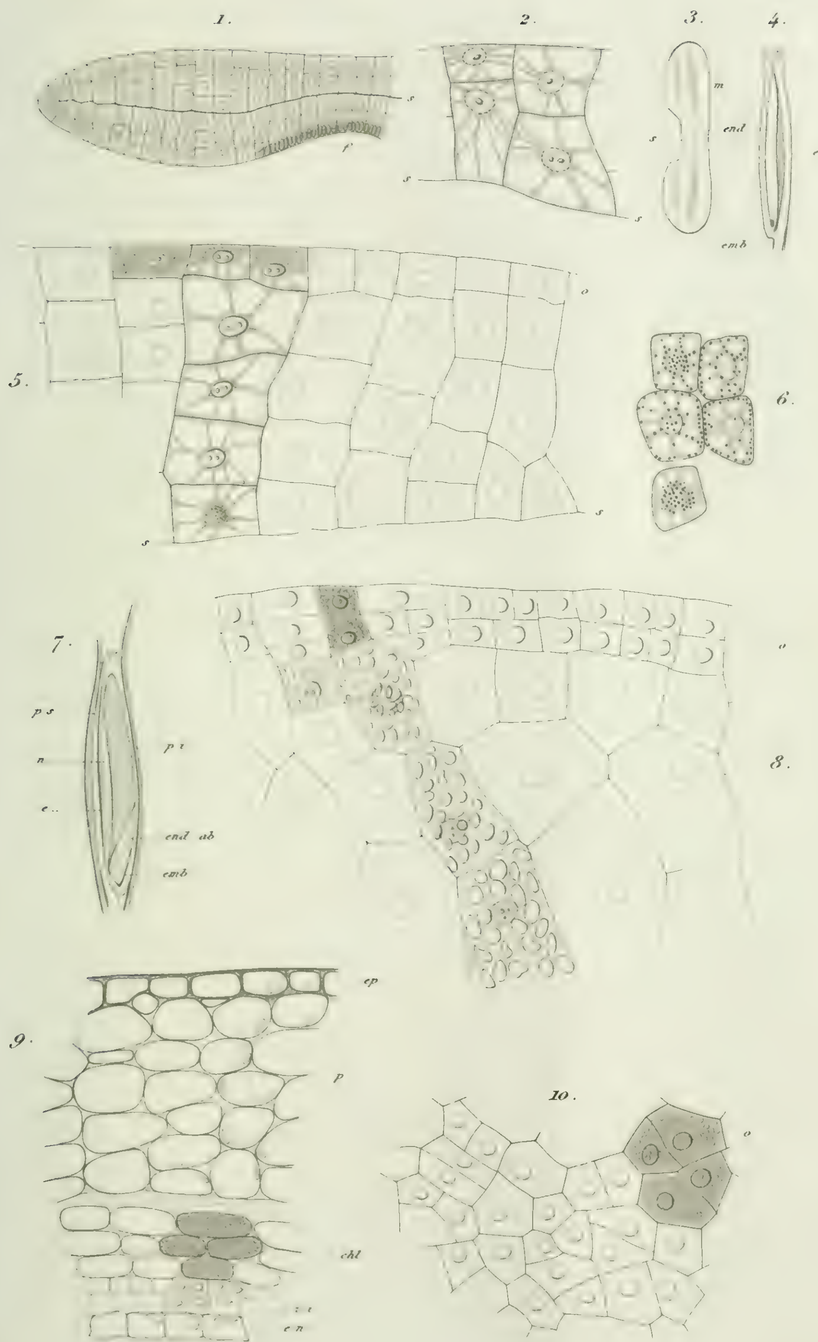
[2]) Om Melbyg og Glasbyg, Side 28—32.

Tab. I.



W. Johannsen del. Lovendal sc.

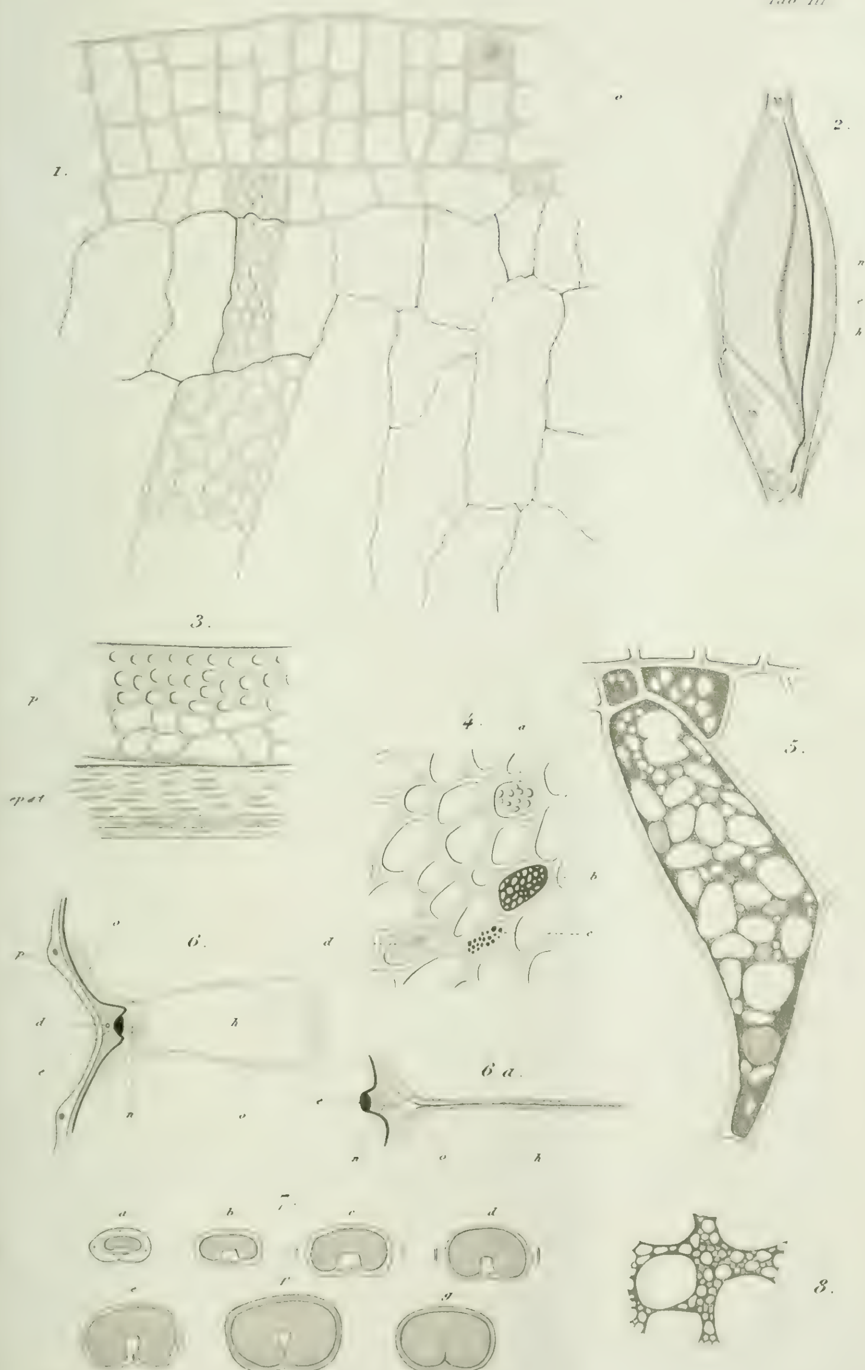
Tab. II



W. Johannsen del.

Lovendal sc.

Tab. III



W. Johannsen del. Lovendal sc.

FORKLARING TIL TAVLERNE.

TAVLE I.

Fig. 1. Mediant Længdesnit af Byggens Frugtknude, kort efter Befrugtningen c. $\frac{16}{1}$. Skematiseret, ligesom Fig. 2 og 3. Til venstre Bugsiden, til højre Rygsiden. a. det ledende Væv; b. Æghindernes Top; chl. de Bladgrønt førende Celler; d. Karstrængen ved Bugsømmen; m. Kimmunden. I yngre Frugtknuder er den vendt endnu mere mod Siden. se. Kimsækken med Indhold.

- 2. Lodret paa Medianplanet udført Længdesnit, samme Stadium som Fig. 1 c. $\frac{16}{1}$. Snittet tænkes lagt skraat nedad gjennem den arbærende Del af Frugtknuden. Figuren er tegnet efter flere Præparater. a., b. og chl. som i Fig. 1; c. Strænge, der tabe sig oppe i Arrene.

- 3. Tværsnit af Frugtknuden, ført over Midten af Ægrummet. c. $\frac{21}{1}$. Frøhviden bestaar af et Lag nogne Celler. a, b, c, d. Strænge; e. Æggets Tilhæftningssted, hvorfra forskjellige Hinder udspringe (Sml. S. 105); chl. og ie. som i Fig. 8.

- 4-7. Mediane og lodret paa Medianplanet udførte Længdesnit af Frugtknuden hos Hord. macrolepis var. nigr. 4 & 5 ved Befrugtningstiden, 6 & 7 nogen Tid efter; l. Lodikler c. $\frac{4}{1}$. (Sml. S. 106—107).

- 8. Brudstykke af Fig. 3, (lidt nedenfor b.) c. $\frac{250}{1}$. ep. Overhud; p. farveløst, Stivelse førende Parenkym; chl. Bladgrønt og Stivelse førende Celler, strakte paa tværs; ei. Frugtknudens indre Overhud; ie. Æggets ydre Hinde; ii. den indre Æghinde; en. Ægkjærnens Overhud; n. Rest af Ægkjærnen; end. den unge Frøhvide, nogne Celler.

- 9. Kimsækken før Befrugtningen, c. $\frac{70}{1}$. (Sml. Fig. 12).

- 10. Samme kort efter Befrugtningen; »orienteret« som i Fig. 9, samme Forst. Centralkjærnen maaske begyndt

Delingerne. a. Antipodeceller; c. Centralkjærne; s. og e. Kimblære og Synergider. Antipodecellerne ligge ikke mere i Bunden af Kimsækken (sml. Fig. 9); ved Præpareringen løsnede de nævnte Celler sig fra deres Plads, ved x.

Fig. 11. Toppartiet af Æghinderne i den ubefrugtede Frugtknude c. $\frac{250}{1}$; ie. ydre Æghinde; ii. indre Æghinde, hvis inderste Lag har delt sig; en. Ægkjærnens Overhud. Kalipræparat.

- 12. = Fig. 9 c. $\frac{250}{1}$. Bogstaverne som i Fig. 10. Protoplasmastrængene ere tegnede for tykke. En Antipode er falden ud af Præparatet.
- 13. Tværsnit af Frøhviden af et c. 4,5 Mm. højt Korn (Sml. S. 109) c. $\frac{70}{1}$. f. Fureegnen. (Bugsiden).
- 14. En Del af Fig. 13, c. $\frac{250}{1}$.
- 15. Længdesnit af Frugtknuden i samme Stadium c. $\frac{4}{1}$.
- 16. En Del af Frøhviden, (end). med nogle Antipodeceller, (a) c. $\frac{120}{1}$. Figuren svarer til Fig. 3 og 8 (S. 109).
- 17. a-g. Forskjellige Former af Cellekjærner i Delingsstadier (S. 109) c. $\frac{250}{1}$.

TAVLE II.

Fig. 1. Halvdelen af Frøhviden af et c. 5 à 5,5 Mm. langt Korn, Tværsnit, c. $\frac{70}{1}$. s. »Sammenvoxningslinie«; det yderste Lag Frøhvideceller have ved Furen (f) begyndt at differentiere sig. (Sml. S. 110).

- 2. En Del af Fig. 1, c. $\frac{250}{1}$. s. som i Fig. 1.
- 3. Tværsnit af Frøhviden i et 6 à 7 Mm. langt Korn c. $\frac{8}{1}$. s. »Sammenvoxningslinie«. De mørke Partier angive, hvor Stivelsekorn først kunne paavises.
- 4. Længdesnit af Kornet paa samme Stadium som Fig. 3. c. $\frac{4}{1}$. emb. Kimen; end. Frøhviden; e. Æggets Tilhæftningslinie.
- 5. En Del af Fig. 3 (ved m.), c. $\frac{250}{1}$. s. Sammenvoxningslinien, der forneden begrænser Figuren; o. de altid stivelsefri Frøhvideceller, endnu kun et Lag mægtige (undtagen nær Furen); Stivelse dannes i Cellerne nær s.
- 6. Celler med ganske unge Stivelsekorn. Præparatet behandlet med Klorzinkjod, c. $\frac{250}{1}$.
- 7. Længdesnit af et c. 8,5 Mm. langt Korn c. $\frac{4}{1}$ skematiseret; emb. Kimen; end. ab. halvt udsugede Frøhvideceller, som snart fortrænges; p s. og p i. Avnerne, som nu begynde at hæfte ved Frugten; e. Æggets Tilhæftningslinie,

den senere »Pigmentstribe«; n. Resten af Ægkjærnen, indenfor hvilken der er et langt Hulrum.

Fig. 8. Tværsnit af et lignende Korns Frøhvide. Brudstykke fra Kornets Side. c. $\frac{250}{1}$; o. som i Fig. 5.

- 9. Af et lignende Korns Frugtknudevæg. Tværsnit af et Parti nær Furen. Bogstaverne som i Tab. I, Fig. 8. (Sml. S. 112). c. $\frac{250}{1}$.

- 10. Tangentialt Snit af de stivelsefri, yderste Lag Frøhvideceller (sml. Fig. 8) c. $\frac{250}{1}$.

TAVLE. III.

Fig. 1. Tværsnit af moden, kun svagt svulmet, Frøhvide i Kanadabalsam. Parti af Rygsiden. c. $\frac{250}{1}$; o. som i Tab. II Fig. 5. (Sml. S. 117).

- 2. Mediant Længdesnit af et modent Korn. c. $\frac{6}{1}$, skematiseret; e. »Pigmentstriben« (Tilhæftningsstedet). Forøvrigt Bogstaverne som i Fig. 6.

- 3. Tværsnit af Avne og Skal, Brudstykke. c. $\frac{250}{1}$; p. Avne; ep. & t. Frugt- & Frøskal.

- 4. Tangentialt Snit af de færdige, stivelsefri Frøhvideceller; Væggene, som de vise sig i svulmet Tilstand. Om Indholdet i Cellerne se S. 119.

- 5. Stivelseførende Celler fra Frøhvidens Omkreds. Stivelsen fjernet for at vise det protoplasmatiske Netværk. c. $\frac{360}{1}$. Sml. Fig. 8.

- 6. Furepartiet af et endnu grønt, temmelig vidt udviklet Korn (Fig. 7 f.). Tværsnit, c. $\frac{21}{1}$; d. Karstræng; e. Æggets Tilhæftningssted; n. Rest af Ægkjærnen; o. de stivelsefri Frøhvideceller; p. Avne; h. saftfyldt Hulrum.

- 6 a. En Del af samme Parti af et fuldt udviklet Korn (Fig. 7 g.), Tværsnit c. $\frac{21}{1}$. Bogstaverne som i Fig. 6. h. viser sig nu kun som en smal Stribe. (Sml. S. 115).

- 7. a-g. Midtvejs førte Tværsnit af Korn i forskjellige Udviklingsstadier. c. $\frac{4}{1}$.

- 8. Netværk af en Stivelse førende Celle fra Frøhvidens dybere Egne; som Fig. 5.

Om Vedligeholdelse af konstant Temperatur.

Af

Lavrits Knudsen.

Naar man ved Opvarmning med Gas vil vedligeholde en meget konstant Temperatur, er det ikke tilstrækkeligt blot at anvende en Thermoregulator. For alle saadanne, der i Principet ere indrettede som Reichert's Thermoregulator (se Fresenius, Zeitschr. f. an. Chemie, 1872, pag. 35), ɔ: hvor et draabeflydende eller luftformigt Legeme ved sin Volumenforandring direkte, eller indirekte ved at virke paa en Kvægsølvsøjle eller et fast Legeme, varierer Udstrømningsaabningen for Gassen, gjælder nemlig, at naar der under Reguleringen finder en vexelvis Aabning og Lukning for Gassen Sted, vil den dermed følgende Tænding og Slukning af Lampen indtræde ved en højere Temperatur, naar Gastrykket er stort, end naar det er lille; og finder der under Reguleringen ikke en fuldstændig Lukning Sted, men blot en Indsnævring af Gastilstrømningsaabningen, maa Indsnævringen, forat bevirke den samme Forandring i Flammens Størrelse, drives videre ved det høje Tryk end ved det lave. Det ses altsaa, at i alle Tilfælde vil den Temperatur, hvorved Thermoregulatoren regulerer, ligge desto højere, jo højere Gastrykket bliver. Den eneste Thermoregulator, som i denne Henseende er uafhængig af Trykket, er den af Scheibler construerede (Fresenius, Zeitschr. f. an. Chemie, 1868, pag. 88), men den kan næppe holdes i Orden i længere Tid. Selvfølgelig kan den ved det variable Gastryk, paa nævnte Maade bevirkede Forandring i Temperaturen, hvorved Thermoregulatoren regulerer, gjøres saa lille, som man vil, ved Anvendelse af tilstrækkelig store Thermoregulatorer, hvilket dog sædvanligt er ubekvemt og bekosteligt. I saa Henseende have de Regulatorer, hvis Virkning bero paa luftformige Stoffers Udvidelse, og navnlig de, som bero paa Forandringen i

mættede Dampes Spænding med Temperaturen, et betydeligt Fortrin, idet de ikke behøve at gjøres synderlig store forat gjøre det variable Gastryks Indflydelse forsvindende, men de lide alle af den Fejl, at være i høj Grad afhængige af Lufttrykket, hvorved de blive meget upaalidelige og aldrig ville kunne holde Temperaturen konstant i længere Tid.

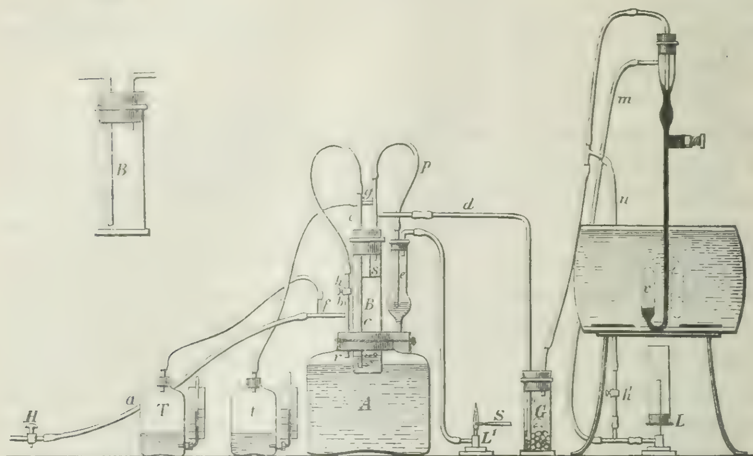
Ved ovenstaaende Betragtning er der kun taget Hensyn til den Gas, som Lampen modtager gjennem Thermoregulatoren. Det er imidlertid i Reglen nødvendigt, og i hvert Tilfælde altid tilraadeligt, tillige at anvende en Stikflamme, forat sikre sig at Lampen, hvis Thermoregulatoren har lukket for Gastilstrømningen, atter kan tændes, naar denne tillader Gassen at passere. Selv om da Stikflammen gjøres saa lille som muligt, vil den dog altid faa en forskjellig Indflydelse, eftersom Gastrykket varierer, og i hvert Tilfælde gjøre en meget nøjagtig Indstilling af Thermoregulatoren umulig. (Smlg. den nedenfor beskrevne Maade at foretage Indstillingen paa; her gjøres Stikflammen netop saa stor som muligt, og dette er netop en væsentlig Aarsag til, at Temperatursvingningerne blive saa smaa.). Den Feil, som følger af Forandringerne i Stikflammens Størrelse, kan selvfølgelig ikke afhjælpes hverken ved at anvende Scheibler's Regulator eller ved at anvende store Regulatorer efter Reichert's Princip.

Som Exempel paa, hvilken Indflydelse en Forandring af Gastrykket kan have paa den Temperatur, hvorved en Thermoregulator regulerer, kan anføres følgende: En Reichert'sk Regulator af sædvanlig Størrelse, men hvor Sideaabningen i Tilledningsrøret var lukket (altsaa ingen Stikflamme), blev, idet Gastrykket holdtes konstant lig 4^{mm} Vandtryk, indstillet paa Temperaturen 53^0 C.; det viste sig da, at Temperaturen varierede mellem $52{,}_{75}{}^0$ C. og $53{,}_{25}{}^0$ C. Blev dernæst Gastrykket forandret til 15^{mm} Vandtryk, medens Regulatorens Indstilling forblev uforandret, holdt denne Temperaturen saaledes, at den svingede mellem $54{,}_5{}^0$ C. og $55{,}_5{}^0$ C. I begge Tilfælde brændte Gasflammen uafbrudt. Ved yderligere at opvarme forsigtigt med en anden Lampe, og derpaa atter lade en langsom Afkjøling foregaa, fandtes i første Tilfælde, at Regulatoren slukkede Lampen, naar Temperaturen var steget til $54{,}_5{}^0$ C., og at Lampen atter tændtes, naar Temperaturen var faldet til 54^0 C. De tilsvarende Temperaturer i det andet Tilfælde vare: $55{,}_{75}{}^0$ C. og $55{,}_{25}{}^0$ C.

Det ses altsaa, at Gastrykket har en meget kjendelig Indflydelse, og at man, naar det gjælder om ved en saadan eller en lignende Regulator at holde Temperaturen nogenlunde konstant,

tillige er nødt til at holde Gastrykket uforandret. Dette kan opnaas ved det i Fig. 2 angivne Apparat.

Fig. 1. Fig. 2.



Principet for dette er følgende: Ledes Gas af p^{mm} Vandtryk gjennem Røret *r* ind i Glasset *B* (Fig. 1), og derfra til en Lampe, vil Trykket i *B* (q^{mm}) blive mindre end p, og Ligevægt vil være opnaat, naar den Mængde Gas, der i en vis Tid og med et Differenstryk q^{mm} kan strømme ud af Lampens Brænderaabning, er lig den Mængde Gas, der i samme Tid og med et Differenstryk $(p - q)^{mm}$ kan strømme ud af Aabningen i Røret *r*. Stiger nu Trykket paa den tilstrømmende Gas til $(p + a)^{mm}$, og fyldes samtidig Vand i *B*, saa at Røret *r* er nedsænket a^{mm} heri, vil den Mængde Gas, der i Tidsenheden strømmer ud af Røret *r*, paa det nærmeste være bestemt ved Overtrykket ved *r*'s Munding, der er $(p + a) - a = p^{mm}$, altsaa det samme som før, og Trykket i *B* vil altsaa ogsaa i dette Tilfælde blive lig q^{mm}[1]). Opgaven er altsaa

[1]) Lægges Formlen for den theoretiske Udstrømningshastighed til Grund, vil Vægten af den i Tidsenheden af Røret *r* udstrømmende Gasmængde, selv om Trykdifferensen er den samme, være større, naar Trykket paa den tilstrømmende Gas er $(p + a)^{mm}$, end naar den er p^{mm}, idet Vægtmængderne ere proportionale med Kvadratrødderne af Vægtfylderne ved Trykkene $(p + a)^{mm}$ og p^{mm}. Disse ere imidlertid meget nær ligestore, saa at, selv om denne Betragtning gjordes gjældende, vilde Trykket q^{mm} i *B* kun voxe meget lidt derved. Jeg har ogsaa fundet, at kun naar Forskjellen mellem p og q er forholdsvis ringe, kan Forøgelsen af q ved en stærk Tilvæxt i p iagttages paa Trykmaalerne.

nu den at bevirke, at Vandet i *B* stiger ligesaa mange mm, som Gastrykket voxer. Dette opnaas paa følgende Maade: Beholderen *A* (Fig. 2), som er lufttæt lukket og næsten helt fyldt med Olie, staar gjennem *r* direkte i Forbindelse med Gasledningen, og gjennem *b*, der er forsynet med Hanen *h*, ledes Gassen videre ned i Røret *B*, der passende gjøres ca. $3\frac{1}{2}^{cm}$ vidt; efter her at have passeret et mere eller mindre højt Vædskelag, gaar Gassen gjennem *d* til Lampen. Glasset *G*, der er fyldt med Bomuld, stoppet løst, men dog saaledes, at der intetsteds findes store Canaler, gjennem hvilke Gassen kan komme til at passere, tjener kun til at holde de af Gassen medrevne Oliepartikler tilbage. I samme Øiemed kan hensigtsmæssigt tillige anbringes en Skjærm *s* i Røret *B*. Ledningerne *a*, *r* og den Del af *d*, som ligger mellem *B* og *G*, bør gjøres tilstrækkelig vide (med en Lysning af 6^{mm}), de første, forat Forandringer i Gastrykket hurtigt kunne influere paa Trykket i *A*, den sidste, for at medrevne Oliepartikler ikke skulle bevirke en Forstoppelse. Idet *A*'s Diameter gjøres stor i Forhold til *B*'s, vil en Stigning af Gastrykket paa a^{mm} meget nær bringe Vædsken i *B* til at stige ligesaa meget, og at denne Forandring i Vædskestandenes Stilling kan ske, beror paa, at Trykket i *A* saa at sige øjeblikkelig voxer med Gastrykket, medens Trykket i *B*, paa Grund af Udstrømning af Gas gjennem Lampen, i Sammenligning dermed kun langsomt kan forøges. Paa Grund af denne Forandring i Vædskestandenes Stilling, der indtræder saa at sige samtidig med Trykforandringen, vil, ifølge det foregaaende, en Trykforøgelse paa den tilstrømmende Gas ikke faa nogen Indflydelse paa Trykket af den Gas, der forlader Regulatoren.

Er Trykregulatoren sat i Forbindelse med en Lampe, som man ønsker skal brande under et konstant Tryk, sker Indstillingen paa følgende Maade: Er det konstante Tryk, som ønskes, 5^{mm}, medens Minimum af Gastryk, som kan ventes at indtræffe, f. Ex. er 10^{mm}, da formindsker man ved Indskydning (ved Hjælp af T-rør) af en eller flere Lamper mellem Gashanen *H* og Trykregulatoren, samt ved at stille paa denne Hane, Trykket paa den Gas, der gaaer til Trykregulatoren til 10^{mm}. Derpaa indstilles Hanen *h*, indtil Trykket paa den Gas, der forlader Regulatoren, er 5^{mm}, idet man stadig passer paa, at Trykket paa den Gas, der gaar til Regulatoren, ikke derved forandres; i saa Tilfælde maa der atter indstilles paa Hanen *H*. Har man saaledes opnaat, at Trykket paa den Gas, der gaar til Regulatoren, er 10^{mm}, medens den, der forlader den, har Trykket 5^{mm}, forøges det første Tryk f. Ex.

til 25^{mm}, og Røret c[1]) sænkes da ned i Olien, og hæves atter eller sænkes yderligere[2]), indtil Trykket paa den bortgaaende Gas igjen er 5^{mm}. Regulatoren er nu indstillet, og man kan da variere Trykket paa den tilstrømmende Gas fra 10^{mm} og opad, uden at Trykket paa den bortgaaende Gas derved forandres. De nævnte Tryk maales paa Trykmaalerne T og t, der staa i Forbindelse med de ellers ved Slange og Klemme lukkede Rør f og g.

Som Vædske i Regulatoren anvendtes i Begyndelsen Vand; dette fordamper imidlertid, hvorved Trykket paa den bortgaaende Gas i Tidens Løb forøges. Senere anvendtes Olivenolie, som ikke frembyder denne Mangel, og ved Hjælp af hvilken man i saa at sige ubegrændset lang Tid kan holde Trykket konstant.

Som Exempler paa, hvorledes Trykregulatoren arbejder, anføres følgende. I hvert af disse er der angivet det supponerede Minimumstryk paa den til Regulatoren strømmende Gas, og det konstante Tryk, paa hvilken den er indstillet. Tallene, der staa ud for T, angive Trykket paa den Gas, der gaar til Regulatoren, de tilsvarende ud for t Trykket paa den Gas, der forlader den. Tallene i Parenthes angive de Tryk, man vil faa, naar Trykregulatoren sættes ud af Virksomhed derved, at Røret c løftes ud af Olien.

I. Trykregulatoren blev sat i Forbindelse med en almindelig Bunsensk Lampe.

Ex. 1. Minimumstrykket: 5^{mm}; det konstante Tryk: 2^{mm}.

$T = 5^{mm} - 16^{mm} - 35^{mm}\ (35^{mm}) - 40^{mm}\ (40^{mm})$

$t = 2^{mm} - 2^{mm} - 2^{mm}\ (10^{mm}) - 2^{mm}\ (12^{mm})$

Ex. 2. Minimumstrykket: 10^{mm}; det konstante Tryk: 5^{mm}.

$T = 10^{mm} - 35^{mm}\ (35^{mm}) - 44^{mm}$

$t = 5^{mm} - 5^{mm}\ (12^{mm}) - 5^{mm}$

Ex. 3. Minimumstrykket: 10^{mm}; det konstante Tryk: 7^{mm}.

$T = 10^{mm} - 27^{mm} - 35^{mm} - 45^{mm}\ (45^{mm})$

$t = 7^{mm} - 7\frac{1}{2}^{mm} - 8^{mm} - 8\frac{1}{2}^{mm}\ (25^{mm})$

Ex. 4. Minimumstrykket: 10^{mm}; det konstante Tryk: 2^{mm}.

$T = 10^{mm} - 30^{mm} - 35^{mm}\ (35^{mm})$

$t = 2^{mm} - 2^{mm} - 2^{mm}\ (5^{mm})$

Ex. 5. Minimumstrykket: 15^{mm}; det konstante Tryk: 10^{mm}.

$T = 15^{mm} - 30^{mm} - 36^{mm}\ (36^{mm}) - 46^{mm}\ (46^{mm})$

$t = 10^{mm} - 10^{mm} - 10^{mm}\ (22^{mm}) - 10^{mm}\ (28^{mm})$

---

[1]) Dette er forneden skraat afslebet under en Vinkel paa ca. 45°.

[2]) Proppen i B gjøres bedst af Kork, tættet med Lak eller Vox. Indgnides da Hullet til Røret c med Olie, lader dette Rør sig let bevæge, selv efter lang Henstand. Det samme gjælder om Røret c i »Ventilen« (se nedenfor).

II. Trykregulatoren blev forbunden med 3 Bunsenske Lamper, den ene med stærkt udvidet Brænderaabning:[1])

Ex. 1. Minimumstrykket: 10^{mm}; det konstante Tryk: 2^{mm}.

$T = 10^{mm} — 30^{mm} (30^{mm}) — 40^{mm}$

$t = 2^{mm} — 2^{mm} (5^{mm}) — 2^{mm}$

Ex. 2. Minimumstrykket: 10^{mm}; det konstante Tryk: 5^{mm}.

$T = 10^{mm} — 35^{mm} (35^{mm})$

$t = 5^{mm} — 5^{mm} (12^{mm})$

Ex. 3. Minimumstrykket: 10^{mm}; det konstante Tryk: 7^{mm}.

$T = 10^{mm} — 30^{mm} (30^{mm})$

$t = 7^{mm} — 7^{mm} (18^{mm})$

Ex. 4. Minimumstrykket: 15^{mm}; det konstante Tryk: 10^{mm}.

$T = 15^{mm} — 32^{mm} (32^{mm}) — 38^{mm}$

$t = 10^{mm} — 10^{mm} (20^{mm}) — 10^{mm}$

De øieblikkelige Svingninger i Gastrykket kan Regulatoren paa Grund af Oliens Tykflydenhed ikke hæve. Disse faa imidlertid heller ingen Indflydelse, naar Regulatoren skal anvendes til Opnaaelse af konstant Temperatur, idet de maa antages at ophæve hinanden.

Indsnævres eller lukkes imidlertid Ledningen *d*, der fører Gassen bort fra Regulatoren, vil Trykket efterhaanden stige, i sidste Tilfælde indtil det bliver lig Trykket paa den tilstrømmende Gas. Dette vil altsaa finde Sted, naar der mellem Trykregulatoren og Lampen er indskudt en Thermoregulator, og denne delvis eller helt lukker for Gastilstrømningen til Lampen. Trykregulatoren vil da gaa helt ud af Virksomhed, og hvis der lukkes helt, vil Trykket paa den Gas, der strømmer til Thermoregulatoren, altsaa stige til det i Ledningen værende variable Tryk. Forat hindre dette, anbringes i saa Tilfælde en »Ventil«, idet Gassen, foruden at gaa gjennem *d* til Lampen *L*, tillige kan passere gjennem *e* til Lampen L^1. Røret *e*, der forneden er skraat afskaaret omtrent under en Vinkel paa 45^0, dypper i Olie til en Dybde forskjellig efter det konstante Tryk, man vil have paa den Gas, der gaar til Lampen *L*. Ved Stikflammen *S* sørges for, at den Gas, der maatte passere Ventilen, bliver forbrændt. Indsnævres da under disse Omstændigheder Udstrømningsaabningen i Thermoregulatoren, eller lukkes den helt, vil Gassen passere bort gjennem L^1, uden at Trykregulatoren gaar ud af Virksomhed, og altsaa uden at Trykket

[1]) Det er en Selvfølge, at Vidden af de Kanaler, Gassen skal passere, er bestemmende m. H. t. det Antal Lamper, Trykregulatoren kan forsyne med Gas af konstant Tryk.

paa den Gas, der gaar til Thermoregulatoren, stiger. Herved finder imidlertid et Tab af Gas Sted, der dog, naar det konstante Tryk ikke vælges højere end nødvendigt, og Omgivelsernes Temperatur ikke varierer altfor meget, kun er meget ringe (se nedenfor). Da Lampen L^1 idelig slukkes og tændes, er det heldigt, som antydet paa Fig. 2, at tage Røret af; for saaledes at udelukke al Mulighed for at den skal slaa ned. For at gjøre Gassens Passage gjennem »Ventilen« saa let som mulig, maa L^1's Brænderaabning gjøres stor og med nogle Dages Mellemrum renses.

Som Thermoregulator har jeg anvendt et Apparat af den i Fig. 2 angivne Form. Det er i det væsentlige en Reichert'sk Regulator, blot med den Forskjel, at den Vædske, som ved sin Volumenforandring bevirker Reguleringen, er Vinaand, hvormed Beholderen v næsten er fyldt. Da Vinaand har en meget større Udvidelsescoefficient end Kvægsolv, vil en saadan Regulator, alt forresten lige, være meget mere fintfølende end en almindelig Reichert'sk Regulator, men den kan ikke gives den Form, som denne i Almindelighed har, nemlig saaledes, at den uden videre kan anbringes i en Prop, og selv i meget snevre Aabninger; her maa Aabningen være større, og Proppen, hvis en saadan behøves, maa være delt. Istedetfor en Beholder maa man hellere anvende to (saaledes som antydet paa Fig. 2 ved de punkterede Linier), der da til Gjengjæld kunne gjøres mindre i Diameter, hvorved der opnaas, at Regulatoren, uden at blive mindre fintfølende, lettere følger med Variationerne i Omgivelsernes Temperatur. Skal denne Form af Thermoregulator anvendes ved højere Temperaturer, kan Beholderen hensigtsmæssigt fyldes med Anilin.[1]) Lampen L faar dels Gas gjennem Thermoregulatoren, dels gjennem Ledningen n, der er forsynet med en Hane h^1, hvorved hindres, at Lampen helt kan slukkes. Flammen paa Lampen L bør beskyttes mod Luftstrømninger ved et tilstrækkeligt vidt Lampeglas, der ved Hjælp af en Prop anbringes paa Lampens Rør. I denne Prop maa der naturligvis findes tilstrækkelig store Aabninger for Tilførsel af atmosfærisk Luft. For at hindre Lampen i at slaa ned, er det hensigtsmæssigt omtrent midt i dennes Rør at anbringe et lille Stykke Messing-

[1]) Disse Regulatorer forfærdiges af Hr. Glasinstrumentmager Jacob i Kjøbenhavn. Fyldningen maa foregaa paa Stedet, men frembyder ingen Vanskelighed. Tilledningsrørene, hvoraf jeg anser det for heldigt at have flere med forskjellig Diameter, kan man let selv forfærdige. I Spidsen slibes de med en Fil, befugtet med Terpentinolie, ganske lidt skraat af.

traadnet, som ved en rund Stok bankes op i det. For yderligere Sikkerheds Skyld kan man, naar Flammen kun er meget lille, tillige lukke Lufthullerne forneden i Lampens Rør, eller man kan anvende en Lampe som L^1 ɔ: uden Rør. Forat faa tilstrækkelig stor Flamme ved et svagt Gastryk, kan det være nødvendigt at udvide Brænderaabningen i Lampen.

Indstillingen af Thermoregulatoren i Forbindelse med Trykregulatoren sker paa følgende Maade: Slangen *m* lukkes med en Klemme, saa at Lampen kun kan faa Gas gjennem h^1, som er helt aaben; efterat derpaa tillige Slangen *p* er lukket med en Klemme, indstilles Trykregulatoren paa det Tryk, som antages nødvendigt, men som dog maa ligge noget under Gassens Minimumstryk. Derpaa aabnes for Gassens Udgang gjennem *p*, og medens man med Fingrene lukker for *n*, sænker man Røret *p* saa dybt i Olien, som ske kan, uden at Trykket paa den bortgaaende Gas derved stiger. Vandbadet fyldes derpaa med Vand af den Temperatur, som ønskes vedligeholdt, og naar man da ved at stille paa h^1, maaske tillige i Forbindelse med at nærme eller fjerne Lampen fra Vandbadet, har opnaaet, at den Mængde Gas, som Lampen faar ad denne Vej, selv ved den højeste Temperatur i Lokalet, ikke kan vedligeholde Vandets Temperatur, men dog kun tillader denne at falde meget langsomt, jo langsommere desto bedre, aabnes for Slangen *m*, og Trykregulatoren indstilles atter paa det konstante Tryk, svarende til den saaledes forøgede Udstrømningsaabning. Dernæst fyldes Vand i Vandbadet, indtil Temperaturen i dette er mindst lige saa mange Grader over den Temperatur, hvorved Regulatoren skal regulere, som Temperaturen i Lokalet kan antages at falde om Natten, og har man da overbevist sig om, at Lampen *L* ved Forsyning med Gas baade gjennem *m* og *n* er istand til yderligere at drive Temperaturen op, tages en Del af det varme Vand op og erstattes med koldt, indtil Temperaturen er den forlangte, hvorpaa Thermoregulatoren indstilles. Kan Lampen, naar den forsynes med Gas baade gjennem *m* og *n* ikke give saa megen Varme, som er nødvendig, maa Brænderaabningen udvides og muligvis tillige Tilledningsrøret i Thermoregulatoren ombyttes med et andet med større Udstrømningsaabning. For at undgaa overflødigt Tab af Gas, bør Tilledningsrøret ikke vælges videre end nødvendigt. Forat Ventilen kan virke tilfredsstillende, maa Røret *e*'s Diameter være lig Diametren af Udstrømningsaabningen i Thermoregulatoren, eller hvis flere saadanne ere satte i Forbindelse med samme Trykregulator, mindst lig Summen af Udstrømningsaabningerne. Røret *e*'s Dia-

meter kan dog paa Grund af Oliens Adhæsion til Glasset ikke godt gjøres under ca. 4mm.

Naar Kvægsølvet i Thermoregulatoren i Løbet af ca. 8 Dage er blevet anløbet paa Overfladen, vil Temperaturen i Badet stige ganske lidt (ved den af mig anvendte Regulator omtrent $\frac{1}{40}$ ° C.), og, hvis man lod den yderligere henstaa, efterhaanden mere. Denne Stigning kan, saa snart den mærkes, hurtigt afhjælpes, idet man blot behøver at dreje Skruen, hvormed der indstilles, tilbage, saa at Kvægsølvet træder helt ned i Udvidelsen, og derpaa strax atter frem. Den samme Indstilling som før opnaas let ved at iagttage Flammens Størrelse før og efter Dreiningen af Skruen. Foretages dette, medens Regulatoren helt eller næsten lukker for Gastilstrømningen, er det bedst, for at undgaa en for stærk Opvarmning, samtidigt at knibe Slangen *m* helt sammen med Fingrene. At Slangerne, der anvendes, ere gjorte godt rene indvendigt, er aldeles nødvendigt, selv om der anvendes sort Kautschukslange.

I et Forsøg havde det anvendte Vandbad en Diameter lig 22cm og en Højde lig 16cm; 1cm fra Bunden var anbragt en Mellembund, hvis Diameter var 18cm, og som i Midten havde en Aabning paa 4cm i Tversnit. Det var fyldt med Vand til 1cm fra Overkanten. Thermoregulatorens Beholder var 9cm lang og 16mm tyk. Vandet var dækket med et tyndt Lag Olie, men forresten var Vandbadet aldeles ikke isoleret. Temperaturen maaltes dels ved et fast Thermometer, anbragt saaledes, at dets Beholder befandt sig i den halve Højde af Thermoregulatorens, og dels ved andre løse Thermometre, der iforvejen vare nøjagtigt sammenlignede med det faste. Alle Thermometrene angave $\frac{1}{10}$ ° C., og hver Inddeling svarende hertil var omtrent 1mm. Thermoregulatoren blev indstillet paa 45,5° C. Temperaturen holdt sig da i Løbet af 1 Maaned saa konstant, at den højest varierede $\frac{1}{10}$ ° C., og ved de løse Thermometre fandtes Temperaturen paa de mest forskjellige Steder i Badet kun at afvige omtrent $\frac{1}{20}$ ° C. fra den, som Thermometret i Midten angav. Ved et andet Forsøg, hvor den konstante Temperatur var 36° C., men hvor Vandet ikke var dækket af et Olielag, erholdtes en ligesaa konstant og ensartet Temperatur i Vandbadet, naar dettes Vandstand holdtes konstant ved Hjælp af en Mariottes Flaske[1]). En saadan er det dog ogsaa heldigt at

[1]) Ifølge hvad der ovenfor er sagt om Indstillingen, kunde Stikflammen i dette Tilfælde ved det valgte konstante Gastryk (5mm) ikke vedligeholde Temperaturen 36° C. i Vandbadet. Lukkes imidlertid for *m*, og forøges Gastrykket til 10mm, drev Stikflammen i Løbet af ca.

anvende, selv om Vandet er dækket af et Olielag. Under disse Forsøg varierede Gastrykket i hvert Døgn fra ca. 12mm til ca. 55mm Vandtryk, og Temperaturen i Lokalet mellem ca. 12° C. og 22° C. Det supponerede Minimumstryk paa den til Trykregulatoren gaaende Gas var 10mm Vandtryk, og det konstante Tryk paa den Gas, der forlod denne, var 5mm. Ved et Forsøg, hvor paa en Gang 3 saadanne Thermostater bleve forsynede med Gas paa 5mm Vandtryk fra samme Trykregulator, og hvor de konstante Temperaturer laa mellem ca. 35° C. og ca. 50° C., beløb den Mængde Gas, der i Døgnet gik bort gjennem Lampen L^1, sig højest til 9 Kubikfod.

Sættes flere Vandbade i Forbindelse med samme Mariottiske Flaske, maa man under Indstillingen af et enkelt af disse sætte dette ved en Klemme ud af Forbindelse med den Mariottiske Flaske og de andre Vandbade, da der ellers ved den under Indstillingen foregaaende Forandring i Vandstanden vil løbe Vand fra det ene Bad over i det andet, hvilket baade virker forstyrrende paa Indstillingen og paa de andre Vandbades Temperatur. Selvfølgelig maa man efter Indstillingen sørge for, at Vandstanden i Badet er den, der vedligeholdes af den Mariottiske Flaske. Naar en Gjenstand skal anbringes i Badet, bør den iforvejen være opvarmet til en Temperatur nær den, som findes i dette, og ved Borttagelse af Vand bør man sørge for, at Vandstanden forbliver uforandret. Skal omvendt en Gjenstand, som er anbragt i Vandbadet, tages op, bør dette midlertidigt sættes ud af Forbindelse med den Mariottiske Flaske og først atter forbindes med denne, efterat man har fyldt op med Vand af den Temperatur, som holdes i Badet, indtil den Vandstand er naat, som vedligeholdes af den Mariottiske Flaske. Iagttages disse Ting, finder der aldeles ingen Forstyrrelse Sted i Thermostatens Gang. Jo større en Thermostat er, desto mindre nødvendigt bliver det at iagttage saadanne Forsigtighedregler, og desto mindre Fordringer stilles der til Reguleringen af Blusset.

Om Trykregulatoren i Forbindelse med Thermoregulatoren ved en nøjagtig Indstilling kan holde Temperaturen ligesaa konstant, naar denne overstiger ca. 50° C., har jeg ikke havt Lejlighed til at undersøge, men ved Anvendelse af en tilstrækkelig Isolering er der ingen Grund til ikke at antage dette.

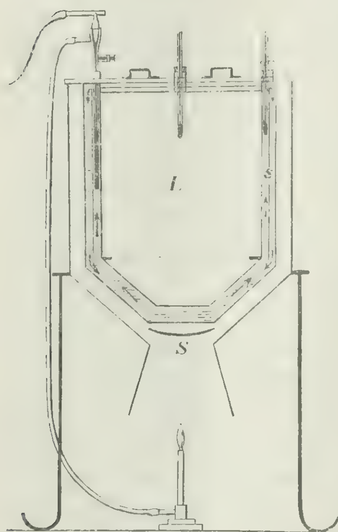
Ej heller har jeg prøvet, hvorledes Forholdene stille sig i et

---

2 Timer ved dette Tryk Temperaturen op til 44° C. Det sees altsaa, at Gastrykket ved at forandre Stikflammens Størrelse kan faa en meget betydelig Indflydelse paa Temperaturen.

Luftbad. Her vil sikkert Indbringelsen af nye Gjenstande, alt forresten lige, virke mere forstyrrende paa Badets Temperatur, end hvis dette er fyldt med Vand. Ligeledes vil Omgivelsernes Temperatur faa mere Indflydelse, saa at det sikkert her altid bliver nødvendigt at anvende Isolering. En hensigtsmæssig Form af et saadant Luftbad er den i sine Hovedtræk i Fig. 3 angivne, hvilken kun er en lidt ændret Form af Horstmann's Thermostat (Annalen der Oenologie, Bd. III. pag. 4). *L* er den Luftmasse, hvis Temperatur skal holdes konstant; den er omgivet af en Kappe med Vand. Formen, som denne har forneden, tilsigter at lette Vandets Circulation, og Skjærmene *s* tvinge dette til at passere i den ved Pilene angivne Retning; derved kommer det yderste Vandlag tillige til at virke isolerende. Isoleringen sker iøvrigt kan ved Luft. For at Vandet let kun cirkulere, bør Vandlagets Tykkelse ikke gjøres for ringe; en Tykkelse paa ca. 4^{cm} vil være passende. For at Væggene bedre kunne modstaa det ikke ubetydelige Vandtryk, gjøres Thermostaten bedst cylindrisk. Bundene maa afstives mod hinanden ved paaloddede Blikvinkler. Heldigt er det ogsaa at anvende saadanne mellem de cylindriske Vægge. Ved Anbringelsen af disse Vinkler maa man sorge for saa lidt som muligt at hindre Vandets Cirkulation. Da det yderste Vandlag virker isolerende, behøves der paa Siderne og forneden kun et enkelt isolerende Luftlag, ca. 2^{cm} tykt. I Laaget anvendes derimod hensigtsmæssigt 2—3 Luftlag, hver paa $\frac{1}{2}^{cm}$—1^{cm} Tykkelse. Skjermen *S* er af temmelig tykt Jern og tjener blot til at beskytte Bunden mod direkte at paavirkes af Flammen. Et billigt og hensigtsmæssigt Materiale til et saadant Luftbad er forblyet Jern, som for yderligere at beskyttes mod den skadelige Indvirkning af Forbrændingsprodukterne fra Gassen kan males med Mønniefarve. Carlsberg Laboratoriet ejer et stort Exemplar af en saadan, som blot ved Anvendelse af en almindelig Reichert'sk Regulator holder Temperaturen meget konstant.

Fig. 3.



Istedetfor de paa Fig. 2 angivne sammensatte T-rør kan selvfølgelig anvendes almindelige T-rør forbundne med Kautschukslange.

Apparatet kan saaledes sammensættes med hvad der findes i ethvert Laboratorium.

Den Mangel ved Trykregulatoren, at den, for at regulere Trykket, maa formindske det, har den tilfælles med alle hidtil bekjendte Apparater af lignende Art. Naar man imidlertid blot anvender tilstrækkelig store Brænderaabninger, kan man i Almindelighed ligesaa godt arbejde med et ringe Gastryk, som med et stort.

En anden Mangel er den, at Trykregulatorens Indstilling maa forandres efter Udstrømningsaabningens Størrelse. Er den derfor allerede i Forbindelse med en Thermoregulator, som er i Gang, kan den ikke uden videre forbindes med en ny saadan. Den maa, som antydet, indstilles paany. Dette sker da paa den ovenfor beskrevne Maade (dog bemærkes, at ved »Ventilen« er der intet at forandre), idet man til Indstillingen vælger det Øieblik, da den førstnævnte Thermoregulator frembyder Maximum af Udstrømningsaabning.

20212

Hvor ringe en Infektion af „vild Gjær" kan efter Hansens Methode paavises i en Undergjærmasse af Saccharomyces cerevisiæ?

Af

Just Chr. Holm og S. V. Poulsen.

Af Hr. Dr. Hansens Undersøgelser over »Sygdomme i Øl, fremkaldte af Alkoholgjærsvampe« (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, II B., 2 Hefte, 1883, p. 93, og Zeitschr. für das ges. Brauwesen, München 1884, p. 273), fremgaar det, hvor stor en Indflydelse en Indblanding af saakaldet »vild Gjær« i den almindelige Bryggeri-Undergjær kan have.

Det er derfor af største Betydning at kunne paavise en saadan Indblanding, og hertil er Askosporedannelsen hos Gjærcellerne for Øjeblikket det eneste analytiske Middel.

Idet vi henvise til ovennævnte Forfatters Hovedafhandling herom (II B., 2 Hefte), skulle vi her kun erindre om, at det er dels den forskjellige Tid, i hvilken de forskjellige Arter ved en vis bestemt Temperatur udvikle deres Askosporer, dels hver enkelt Arts Maximums- og Minimumstemperatur, som betinger Askosporedannelsens analytiske Anvendelse (se ogsaa denne Forfatters Afhandling, I B., 4 Hefte, 1882, p. 400—401, Anm.). Desforuden har Hr. Dr. Hansen til forskjellig Tid mundtlig meddelt os og sine andre Elever her paa Laboratoriet Oplysninger om dette Spørgsmaal, og det er navnlig paa Grundlag heraf, at Planen til vore efterfølgende Experimenter blev lagt.

Ved enhver analytisk Methode er dens Finhed af stor, ofte af afgjørende Betydning; det laa derfor nær i dette Tilfælde at bestemme, hvor ringe Mængder »vild Gjær« man er i Stand til at paavise som Indblanding i Hovedgjærmassen.

Dyrkningsforsøgene for at bringe Gjærcellerne til at udvikle Askosporer ere udførte ved Hjælp af Gibsblokke og med unge, kraftige Celler (se den citerede Afhandl. II B. 2 Hefte, p. 65).

Til Forsøgene anvendtes som Hovedgjærmasse en Undergjærform af S. cerevisiæ (Bryggeriets rene Gjær Nr. 1), den Art, hvorpaa Gl. Carlsbergs Bryggeriers og et større Antal andre, navnlig nordiske, Bryggeriers Drift er baseret; som Indblandingsgjær anvendtes følgende vilde Gjærformer:

S. Pastorianus I.
S. Pastorianus III.
S. ellipsoideus II.

Disse findes beskrevne i sidstnævnte Afhandling, p. 68 og flgd.

Af alle 4 Former benyttedes udelukkende Renkulturer. At ovennævnte vilde Gjærformer valgtes, har sin Grund i, at disse ifølge Dr. Hansens Forsøg fremkalde Sygdomme i Øllet (Tykhed og bitter Smag), og da de ere de eneste, hvorom dette er vist, var der ingen særlig Anledning til at prøve andre. Ved 25° C. danne disse Anlæg til Askosporer allerede efter 25—28 Timer, medens Bryggeriets rene Gjær Nr. 1 ved samme Temp. først efter 5 Døgn udvikler yderst faa eller som oftest slet ingen. Her er altsaa en betydelig Forskjel. — Hvis alle Cellerne i en Gibskultur gave Askosporer, vilde vor Undersøgelse være overflødig, alt var da allerede i Forvejen givet i Dr. Hansens Afhandlinger; dette er imidlertid ikke Tilfældet, thi der bliver altid et vist Procentantal, som under de givne Forhold ikke udvikle disse Formeringslegemer; hvor stort dette Procentantal er, derom foreligger der til Dato ingen Undersøgelse.

Gjæren avledes i Pasteurske Kolber (1/2 og 1/8 Liter), halv fyldte med steriliseret Siposeurt (c. 14 % Ball.); fra de større fik vi c. 5 Kub.-Cent., fra de mindre 2—3 Kub.-Cent. temmelig tykflydende Gjær. Udbyttet varierede ikke saa lidt, og navnlig spillede det en Rolle, hvor fast Gjæren laa. Ligger den nemlig løst, gaar en ikke ringe Mængde tabt ved Afheldningen af Urten. Dette var navnlig Tilfældet med de vilde Arter, hvorfor ogsaa Gjærmassen fra disse undertiden blev noget tyndere end fra S. cerevisiæ.

Efterat der i disse Pasteurske Kolber var avlet unge, kraftige Celler ved 1 Døgns Kultur ved c. 25° C., heldtes næsten alt Øllet fra, og med den tiloversblevne Rest rystedes Bundgjæren op. Denne heldtes op i steriliserede Glas, der vare dækkede med steriliserede Glasplader. Der sørgedes for, at den vundne Gjærmasse fra de forskjellige Arter var saavidt muligt af samme Koncentration. Ved Hjælp af steriliserede Pipetter, der i deres øvre Ende vare for-

synede med steriliserede Vatpropper, afmaaltes dernæst den Mængde, man ønskede. Var Talen f. Ex. om en Gjærblanding med 5 % vild Gjær, toges 10 Kub.-Cent. af S. cerevisiæ og $^1/_2$ Kub.-Cent. af vild Gjær; til en Gjærblanding med 1 % vild Gjær toges 10 Kub.-Cent. af S. cerevisiæ og $^1/_{10}$ Kub.-Cent. af den vilde Gjær ɔ: med den Rørpipette, vi benyttede, 2 Draaber o. s. v. Gjærblandingerne samledes i steriliserede Glas og omrørtes der omhyggeligt, inden de udsaaedes paa Gibsblokkene.

Det vilde blive for vidtløftigt og er tillige unødvendigt at omtale udførligt alle de Forsøg, vi anstillede, da de alle foregik paa samme Maade, idet naturligvis kun den indblandede Gjærs Mængde var forskjellig i de forskjellige Tilfælde. Vi begyndte med en Indblanding af 10 % vild Gjær. Fra hver Blanding fremstilledes 2 Gibsblokkulturer (6 i alt), derefter udsaaedes til yderligere Sikkerhed paa 2 andre Gibsblokke en Blanding af S. cerevisiæ og alle 3 vilde Arter. Som Kontrol endelig henstilledes samtidig Renkulturer paa Gibsblokke af de omtalte 4 Arter hver for sig. Disse 12 Gibsblokke bleve stillede i en Thermostat ved 25° C. og undersøgte efter c. 40 Timers Forløb. Resultatet var, at Vegetationerne paa Blokkene med Renkulturerne af de vilde Arter indeholdt talrige Celler med Askosporer, at de 8 Blokke med 10 % Indblanding indeholdt mange, men at Blokken med Renkultur af S. cerevisiæ ikke indeholdt en eneste. Vi fremhæve, at der saavel i disse som i de andre Forsøg bestandig ved Kontrolprøve med S. cerevisiæ blev givet fuld Sikkerhed for, at de iagttagne Askosporer ikke stammede fra denne, men fra Sygdomsgjæren.

Et ganske lignende Forsøg anstilledes med en Indblanding af 5 % og med samme Resultat.

Derefter forsøgtes en Indblanding af 3 % vild Gjær, altsaa c. $^1/_{33}$ af hele Gjærmassen. Her blev 8 Gibsblokke med denne Indblanding af de 3 vilde Arter hensatte i Thermostaten ved 25° C. og undersøgte efter c. 2 Døgns Forløb. Resultatet var, at der uden Vanskelighed paavistes Celler med Askosporer. Forsøget gjentoges med samme Resultat.

Paa lignende Maade anstilledes en Række Forsøg med en Indblanding af 2 % og 1 %, hvor altsaa henholdsvis kun $^1/_{50}$ og $^1/_{100}$ af Gjærmassen var vild Gjær; ogsaa ved denne ringe Indblanding var Resultatet, at Celler med Askosporer uden Vanskelighed lode sig paavise efter c. 2 Døgn. Naturligvis var der en ikke ringe Forskjel i Antallet af Celler med Askosporer i de mikroskopiske Præparater, som toges fra de forskjellige Blokke med samme Indblandingsprocent; dette er uundgaaeligt ved et

Forsøgsobjekt som Gjær, hvor hverken Koncentrationen eller den afmaalte Mængde af de forskjellige Arter i den Forstand kan blive nøjagtig den samme som f. Ex. Afvejninger paa analytisk Vægt af et dødt, kemisk Stof. Vi have bestræbt os for, at Koncentrationen af de forskjellige Arter var saavidt muligt ens; dog var, som allerede ovenfor bemærket, Gjærmassen, som hidrørte fra de vilde Arter, stundom tyndere end Gjæren fra S. cerevisiæ, hvilket vil sige, at Indblandingen snarere har været under end over den i ethvert Tilfælde angivne; Methoden er altsaa rimeligvis endnu finere end her er angivet.

Fremdeles anstilledes et Forsøg (8 Gibsblokke) med Indblanding af $^1/_2$ %, hvor altsaa $^1/_{200}$ af Gjærmassen var vild Gjær. Det lykkedes ogsaa her efter 44 Timer at paavise enkelte Celler med Askosporer i alle Kulturerne med Sygdomsgjær; kun ved et Par af disse var det nødvendigt at tage flere Præparater, inden Celler med Askosporer fandtes. Forsøget gjentoges med samme Resultat.

Man kunde naturligvis ved anstillede Forsøg paavise en endnu ringere Indblanding, idet man ved at tage mange Præparater fra hver Kultur og ved at gaa dem nøje igjennem vilde kunne finde en enkelt eller nogle ganske faa Celler med Askosporer, men da det er uden praktisk Betydning, have vi bestemt at standse her.

Det maa ogsaa siges at være et for Methodens praktiske Brugbarhed tilfredsstillende Resultat, vi have opnaaet, nemlig med Sikkerhed at kunne paavise en saa ringe Indblanding af »vild Gjær« som $^1/_{200}$ af hele Gjærmassen. Vi behøve i saa Henseende kun at henvise til Dr. Hansens ovenciterede Afhandling om »Sygdomme i Øl, fremkaldte af Alkoholgjærsvampe«, hvor det er paavist, at naar S. Pastorianus III eller S. ellipsoideus II kun udgjøre $^1/_{41}$ af Paasætningsgjæren, og Gjæringen og Lagringen af Øllet foregaar efter den i gode Bryggerier almindelig brugte Fremgangsmaade, vil den Sygdom (Gjærtykhed), som de ved Tilstedeværelse i større Mængde frembringe, ikke indtræde. For disse Arters Vedkommende er det da mere end tilstrækkeligt at kunne paavise en Indblanding af $^1/_{200}$.

Af Interesse for Analysens Udførelse i Praxis er ogsaa den Hurtighed, hvormed Resultatet kan opnaas. Af Forsøg, som anstilledes i den Retning med en Indblanding af henholdsvis 2 % og 1 %, fremgaar, at man vel allerede efter 30 Timer kan finde ganske enkelte Celler med Askosporer, men at de dog først efter 40 Timer optræde i nogenlunde

rigelig Mængde. Det vil altsaa være det heldigste at oppebie dette Tidspunkt for Undersøgelsen.

Askosporedannelsen kan naturligvis ligeledes anvendes til at afgjøre, om andre Gjærracer end den foran behandlede ere inficerede med Sygdomsgjær eller ej. Bestemmelsen foregaar dog ikke i alle Tilfælde ved samme Temperatur, og der kræves altsaa her en særskilt experimentel Behandling, før Reglen med alle dens Enkeltheder kan gives; dette forbeholde vi os at give Oplysning om i en senere Meddelelse.

Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi.

Af

Emil Chr. Hansen.

V.

Methoder til Fremstilling af Renkulturer af Saccharomyceter og lignende Mikroorganismer.

I Laboratoriets Tidsskrift for 1882 og 1883 offentliggjorde jeg nogle Oplysninger om de Methoder, jeg efterhaanden i Aarenes Løb havde udarbejdet til med Sikkerhed at erholde Renkulturer af Saccharomyceter. Da Arbejdsmaaden kun i de store Træk var omtalt, blev jeg fra flere Sider gjentagne Gange opfordret til at give en udførlig Fremstilling af alle Enkeltheder, en Vejledning for de med saadanne Arbejder endnu Ukyndige til med Sikkerhed og nogenlunde Lethed selv at kunne udføre dem[1]). Grunden til, at jeg først nu imødekommer dette Ønske, er, at andre vigtigere Arbejder hidtil have lagt Beslag paa min Tid, og at jeg forinden Udgivelsen ønskede paany at prøve Et og Andet for at kunne give en saa god og fuldstændig Vejledning som mulig.

Ifølge Sagens Natur maa en saadan komme til at indeholde Beskrivelser af en Mængde Smaating, men da det netop er deraf, det Hele opbygges, have de Krav paa Opmærksomhed. Efterstaaende Meddelelser udgjøre en Del af de gjæringsfysiologiske

---

[1]) Der indløber ligeledes temmelig ofte Forespørgseler til mig om de Apparater, der anvendes ved de gjæringsfysiologiske Experimenter i Carlsberg Laboratorium. I den Anledning meddeles herved, at de, forsaavidt de ere af Glas, i Almindelighed erholdes hos Hr. Instrumentmager Jacob, Gothersgade 30 i Kjøbenhavn.

Kursus, som jeg med Bestyrelsens Billigelse i de sidste Aar har afholdt her paa Laboratoriet for fremmede Naturforskere.

Naar vi fremstille en Renkultur af en eller anden Mikroorganisme, da forbinde vi dermed i Almindelighed det Øjemed enten at erholde udviklingshistoriske og morfologiske Oplysninger eller at anstille fysiologiske Experimenter. I første Tilfælde er det Væxt- og Formforandringer, vi ønske at iagttage, og Undersøgelsen kliver derfor naturlig knyttet til Mikroskopbordet. Ved direkte Iagttagelse forfølge vi f. Ex. en Svampespores Spiring og dens fortsatte Udvikling, indtil den derved fremkomne Plante atter selv har dannet Sporer. Det er værd at lægge Mærke til, at der hertil ingen Massekultur kræves, man søger endog at undgaa den, og der kræves ej heller en absolut Renkultur. Om der er nogle enkelte fremmede Organismer tilstede, faar nemlig ingen Indflydelse, forudsat at de blot ikke i kjendelig Grad forulempe den, hvis Udvikling vi ville studere, og at deres Udseende er tilstrækkelig forskjelligt fra dennes, saa at en Forvexling ikke kan finde Sted.

Helt anderledes er det med det fysiologiske Experiment; dette anstilles i de fleste Tilfælde udenfor Mikroskopbordet og for en stor Del uden mikroskopisk Kontrol og fordrer alene af den Grund netop absolut Renkultur, som oftest tillige en Massekultur. Det er kun om denne Art Rendyrkninger, at det Følgende handler.

Vejen, ad hvilken en Renkultur under alle Omstændigheder vil kunne opnaas, ligemeget hvilke fysiologiske og morfologiske Egenskaber vedkommende Mikroorganisme er i Besiddelse af, frembyder sig af sig selv, nemlig Udsæd af een eneste Celle i en i Forvejen steriliseret Næringsvædske paa en saadan Maade, at fremmede Organismer ikke under Dyrkningen kunne snige sig ind. Ligesaa simpel Tanken er, ligesaa store vare de Vanskeligheder, som maatte overvindes, førend Problemet kunde siges at være nogenlunde løst. Talrige Forskere i vor Tid have givet Bidrag dertil, den ene sluttende sig til den anden; Spring findes ikke i denne Udvikling. I de sidste Aar ere Bestræbelserne navnlig gaaede ud paa at gjøre Arbejdet lettere og hurtigere, undertiden paa Sikkerhedens Bekostning.

Mine første Rendyrkninger bleve fremstillede ved Hjælp af en Fortyndingsmethode. Til Cellerne blev der nemlig sat et saa stort

Rumfang steriliseret Vand, at 2 Kub.-Cent. af denne Vandblanding, naar de vare jævnt fordelte deri, skulde indeholde 1 Celle. Af en Række Udsæd, hver paa 1 Kub.-Cent., skulde altsaa kun hveranden bringe en Celle med sig. Paa denne Maade have f. Ex. Nägeli og Fitz fremstillet Renkulturer af Bakterier. Allerede den theoretiske Betragtning viser dog, at man ikke herved alene kan erholde Sikkerhed. Spørgsmaalet bliver da, paa hvilken Maade, det er muligt at skjelne de Kolber, der hver have modtaget flere Celler, fra dem, der hver kun have modtaget een Celle. Til Afgjørelse heraf fandt jeg en vigtig Karakter i Antallet af de dannede Gjærpletter. Overføres nemlig *n* Gjærceller i en Kolbe med Næringsvædske, og rystes derefter Kolben for at fordele Cellerne, saa ville de, efterat Vædsken er kommen i Ro, lejre sig paa Bunden og her danne *n* Pletter. Naar disse have opnaaet en bestemt Størrelse, kunne de med Lethed iagttages med det blotte Øje og tælles. De Kolber, i hver af hvilke kun een Gjærplet har udviklet sig, have ogsaa hver kun modtaget een levende Celle. (Den udførlige Begrundelse heraf findes i min Afhandling fra 1883, p. 55.)

Dette var det nye Bidrag, som mine Studier bragte til Methodens Udvikling paa dette Punkt. Der opnaaedes herved en større Sikkerhed, end der hidtil var kjendt. Om Manipulationerne er der intet Væsentligt at tilføje til det allerede meddelte. (Se Afsnittet »Methoder«, p. 51—57.)

Et væsentligt Fortrin ved denne Methode bestaar deri, at man fra det Øjeblik af, at det virkelig er lykkedes i en Kolbe med Næringsvædske at erholde Udsæd af een eneste Celle, da ogsaa med det Samme har Betingelserne for en Massekultur uden Fare for Infektion udenfra. Men Methoden er kostbar, idet der navnlig kræves et stort Antal Kolber dertil; den fordrer endvidere større Arbejde, større Øvelse og større Omhu end den nedenfor beskrevne. Dette har bevirket, at den nu kun i enkelte Tilfælde benyttes. Har man f. Ex. en Blanding af forskjellige Gjærarter, hvoraf nogle ere kraftige, andre svækkede, og man netop ønsker at isolere de sidste, da vil der som Regel ikke være andet at gjøre end atter at ty tilbage til den. Saadanne Celler komme nemlig som oftest slet ikke til Udvikling i Næringsgelatine (det Substrat, som anvendes ved den følgende Methode), men derimod med større Lethed i Næringsvædsker. Navnlig ved Analyser af Mikroorganismer i Jord har jeg ofte havt Lejlighed til at gjøre disse Erfaringer.

Som bekjendt fremstilles i de sidste Par Aar i Almindelighed Renkulturer af Bakterier efter Koch paa følgende Maade: I flydende Næringsgelatine anbringes nogle af de Celler, hvoraf man ønsker Renkultur, og man søger derpaa saa vidt muligt ved Rystning at fremkalde en jævn Fordeling af dem. Blandingen gydes ud paa en steriliseret Glasplade, som derefter opbevares i et fugtigt Rum ved passende Temperatur, og efterhaanden udvikle de i den stivnede Gelatine indstøbte Celler Vegetationer. Det er imidlertid af sig selv indlysende, at man ikke har Sikkerhed for, at hver af de i Næringsgelatinen udviklede Vegetationer er dannet af een eneste Celle. Forskjellige Arter af Bakterier kunne imidlertid give Pletter af forskjelligt Udseende, heri haves altsaa undertiden et vigtigt Hjælpemiddel. Et saadant mangler imidlertid hos Saccharomyceterne; vil man altsaa af disse fremstille Rendyrkninger, maa man tage Sagen paa en anden Maade. Dette har jeg udført, idet jeg i Stedet for at anbringe Gelatinekulturen paa en almindelig Glasplade, anbringer den paa den nedadvendte Side af et Dækglas, som fæstes til et fugtigt Kammer (Böttcher's); og ved direkte mikroskopisk Iagttagelse sikrer jeg mig, at de Vegetationspletter, som jeg senere benytter til Fremstilling af Massekultur, virkelig stamme hver fra een eneste Celle.

Det er denne Modifikation af Koch's Methode, som nu hyppigst anvendes her paa Carlsberg Laboratoriet og ligeledes i de inden- og udenlandske Anstalter, der efter det herfra givne Mønster beskjæftige sig med for den store Industri at fremstille ren Gjær af udvalgte Racer og med Studiet af Gjærsvampe overhovedet. Om Methodens Begrændsning o.s.v. se min Afhandling fra 1883, p. 57—63. I det Følgende gives den lovede udførlige Fremstilling af alle de derved forekommende Arbejder og de dertil hørende Apparater.

1. Forberedelserne: Som ved andre lignende Experimenter sørges der for, at der er en saavidt mulig støvfri og altsaa kimfri Luft tilstede; hvis det lader sig gjøre, aflaases Værelset en Tid i Forvejen, for at Luften kan komme i Ro. Et lille Arbejdsrum med næsten kimfri Luft kan erholdes ved Hjælp af en Kasse, der netop er saa stor, at man kan føre Armene derind og med tilstrækkelig Frihed bevæge dem derinde; der kræves endvidere, at Kassen faar godt Lys udenfra, og at den har en Skydedør til at trække lodret op i den Højde, man ønsker. Man vadsker det indvendige Rum overalt med steriliseret Vand, lader Kassen derpaa staa aflukket nogen Tid i det Værelse, hvor den skal benyttes, og trækker da forsigtig Skydedøren op. Det Exemplar, Laboratoriet

ejer, har en Højde af 56, en Brede af 63 og en Dybde af 50 Centim. indvendigt Maal. Døren saavel som Loftet og de tre Sider bestaa af store Glasruder i solide Trærammer, medens Bunden er fuldstændig af Træ. Naar Døren er trukken ned, kan den aflaases. I flere Tilfælde vil det maaske være bekvemmere at have en lignende Kasse med mindre Dimensioner. De følgende Beskrivelser gaa imidlertid bestandig ud fra, at Arbejderne udføres i et almindeligt Værelse uden saadant Hjælpemiddel.

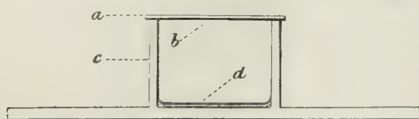


Fig. 1.

Følgende Apparater benyttes: Et Par Pincetter, en halv Snes tynde Glasstænger, 2—3 fugtige Kamre (Böttcher's) med Ringe paa 30 Millim. i Diameter, nogle hertil passende Dækglas og 2—3 Platintraadstykker, hvert 1½ Centim. langt og ½ Millim. tykt, nogle Glasplader og Glasklokker. Fig. 1 er et lodret Gjennemsnit af det nævnte Kammer i en formindsket Maalestok; *a* er Dækglasset, paa hvis Underside, *b*, den i det Efterfølgende beskrevne Dyrkning foregaar; *c* er Kammerets Ring; *d* er et Vandlag, der er anbragt paa Bunden for at hindre Fordampningen. Alle disse Gjenstande maa være flammerensede ved Hjælp af en Gas- eller Spiritusflamme, eller, hvad der er heldigere, indsvøbte i flere Lag Filtrerpapir, steriliserede i en Varmekasse (2 Timer ved 150° C.). Før Brugen maa en tilstrækkelig Afkjøling naturligvis have fundet Sted. Den frie opadvendte Rand af de fugtige Kamres Ring bestryges med Vaseline, og der anbringes lidt steriliseret Vand i deres Bund.[1]) Platintraadstykkerne lægges paa en lille Glasplade saaledes, at de med Lethed kunne gribes med en af Pincetterne, og dækkes med en Glasklokke; det Samme gjælder om Dækglassene og Kamrene.

Et Vandbad paa 30—35° C. holdes i Beredskab tilligemed et Stativ til at fastholde de nedenfor nævnte Chamberland-Kolber (Fig. 2) deri. Af disse fordres et Par (hver paa c. 30 Kub.-Cent.) halvfyldte med steriliseret Vand og et Par halvfyldte med Næringsgelatine; de flammerenses paa deres Overflade og stilles under en Glasklokke, indtil de skulle bruges. De ere, som Fig. 2 viser, lukkede med en tilsleben Glashætte, hvis tynde Rør er fyldt med steriliseret Bomuld. Som Næringsgelatine benyttes 5 % Ge-

---

[1]) Til at fastgjøre Ringene paa Objektglasset kan anbefales en Opløsning af Gelatine i Iseddike, hvortil kort før Brugen sættes fint pulveriseret kromsurt Kali, ligeledes Jensen's Glaslim, Frederiksborggade 20 i Kjøbenhavn.

latine i klar, humlet Urt (c. 14 % Ball.). (Den har vist sig at være god ogsaa i de Tilfælde, hvor man foretager Udsæd af Alkoholgjærsvampe, som ikke kunne forgjære Maltose, f. Ex. Sacch. apiculatus, Sacch. exiguus og et Par Arter, der i Formen ligne sidstnævnte, men som ikke udvikle Endosporer). En ringere Tilsætning end 5 % Gelatine er ikke tilraadelig, hellere derover. I Stedet for Urten kan ogsaa anvendes en Næringsvædske, bestaaende af 10 % Dextrose-Opløsning, hvortil der er sat saa meget Gjærvandsafkog, at det Hele faar en tydelig gul Farve. Naar Næringsgelatine i det Følgende omtales, er derved bestandig tænkt paa den førstnævnte.


Fig. 2.

2. **Fremstillingen af Renkulturen:** Kolberne med Næringsgelatinen opvarmes forsigtig, saa at Indholdet netop bliver flydende, og de anbringes derefter i Vandbadet. Som Udgangspunkt for Renkulturen benyttes helst en Vegetation af unge, kraftige Celler; en ringe Mængde deraf udrøres i en af Chamberland-Kolberne med det steriliserede Vand, saaledes at dette bliver svagt uklart. Ved Omrystning søger man derpaa at erholde en, saavidt mulig, jævn Fordeling af Cellerne, og naar dette er sket, tages ved Hjælp af Glasstængerne Draaber til mikroskopisk Undersøgelse. Saavel ved denne som ved de i det Følgende omtalte mikroskopiske Undersøgelser benyttes en saa svag Forstørrelse som mulig, det vil sige, et Objektiv og et Okular, ved Hjælp af hvilke man endnu netop er i Stand til med Sikkerhed at kunne tydeligt skjelne Cellerne fra tilstedeværende andre Smaalegemer. Herved opnaas det størst mulige Synsfelt, og Undersøgelsen foregaar hurtigere. Benyttes et Mikroskop fra Zeiss i Jena, da anbefales Okular Nr. 1, Objektiv DD og indskudt Tubus. Hensigten med den berørte mikroskopiske Prøve er at erholde et Skjøn over, hvor rig Blandingen er paa Celler. Efter at denne paany er bleven tilstrækkelig omrystet, dyppes et af Platintraadstykkerne deri og overføres hurtigt i en af Kolberne med den flydende Næringsgelatine. Saavel ved dette som ved de senere Forsøg paa at fremkalde en jævn Fordeling af Cellerne søger man at undgaa Dannelse af Skum. Næringsgelatinens Temperatur maa ikke overstige 35° C.; man ønsker overhovedet kun, at den skal kunne holde sig flydende. Har man ved den mikroskopiske Prøve fundet, at Vandblandingen er rig paa Celler, dypper man Platintraaden kun i meget ringe Grad ned deri, f. Ex. 2 Millim.; er det Modsatte Tilfældet, dyppes den derimod dybere ned.

Ved Omrystning af den inficerede Gelatine søger man at erholde en jævn Fordeling af de deri værende Celler. Derpaa tages med en af de steriliserede Glasstænger Draaber til mikroskopisk Undersøgelse. For at denne kan blive tilstrækkelig paalidelig, maa man lave to Præparater; stemme disse overens, har man Grund til at antage, at Cellerne ere blevne jævnt fordelte, og at man har erholdt Gjennemsnitsprøver. Her maa det da afgjøres, om Næringsgelatinen har modtaget et passende Antal Celler eller ej; begaas en grov Fejl i den Retning, er alt det senere Arbejde spildt. Betingelsen for, at Fordelingen af Cellerne i Næringsgelatinen er en saadan, at Renkulturer med Sikkerhed kunne erholdes, er, at de senere fremkomne Vegetationspletter have tilstrækkelig Plads, saa at ingen Sammensmeltning af flere kan finde Sted eller idetmindste ikke hyppig finder Sted. Ved denne Kontrol ønske vi derfor at erholde Oplysning om Cellernes Fordeling, først og fornemlig dog om Afstanden mellem Celle og Celle. Benytte vi sædvanlige mikroskopiske Præparater til denne Prøve, maa det ikke glemmes, at Cellerne i den Gelatine, der skal anvendes til Forsøget, i Virkeligheden ligge hverandre meget nærmere end i disse Præparaters stærkt fladtrykte Draaber. Der kræves overhovedet megen Øvelse for heraf at kunne drage en nogenlunde sikker Slutning. Dette opnaas dermod ved at tage Draaber af den Beskaffenhed (Størrelse, Form o. s. v.), som vi senere ville anvende. Disse anbringes paa almindelige Objektglas eller bedre paa Objektglas med indætsede Kvadrater og da paa selve Indætsningen. Kvadraterne give os nemlig Holdepunkter for den mikroskopiske Undersøgelse, hvorved den følgelig bliver lettere og sikkrere. Dækglas anvendes ikke, og man kan godt foretage Undersøgelsen strax, medens Gelatinen endnu er flydende.

Det er, som foran berørt, en Erfaringssag, at Celler, som i Næringsvædsker kunne vise Livstegn, i flere Tilfælde ikke gjøre det i Næringsgelatine. I Sammenhæng hermed staar, at som oftest ikke alle de i Gelatinen udsaaede Celler komme til at danne Vegetationspletter; alligevel vil Begynderen i Almindelighed finde, at disses Antal overstiger Antallet af de af ham ved Forsøgets Begyndelse iagttagne Celler, idet nemlig flere af sidstnævnte undgik hans Opmærksomhed. Den Fejl begaas overhovedet hyppigst, at der udsaas et for stort Antal Celler.

Er den ønskede Art i Overvægt i den Gjærmasse, der benyttes som Udgangspunkt, da arbejder man bedst med et ringe Antal Celler i vedkommende Næringsgelatine; finder derimod det Modsatte Sted, maa man foretage Forsøget med et saa stort Antal

Celler, som Fremstillingen af en Renkultur overhovedet tillader; dette gjælder ogsaa, hvis vor Opgave gaar ud paa ved eet Forsøg samtidig at erholde Renkulturer af flere oprindeligt sammenblandede Arter. I de sidstnævnte Tilfælde kræves naturligvis en dobbelt Agtpaagivenhed, idet Faren for, at en Vegetationsplet kan være dannet af flere Arter paa een Gang, da er større, end naar vedkommende Gjærmasse fra Begyndelsen bestod af den ønskede Art i Overvægt.

Viser Kontrollen os, at der er udsaaet enten for faa eller for mange Celler, maa vi i det ene Tilfælde føje flere Celler, i det andet mere Gelatine til, alt efter forudgaaet Beregning. Finde vi f. Ex., at der er dobbelt saa mange Celler tilstede i vor Blanding, som vi ønske, erholdes den rette Fortynding ved at tilsætte en ligesaa stor Portion Gelatine som den allerede tilstedeværende, og ønskes omvendt et dobbelt saa stort Antal Celler, som der allerede findes, opnaas dette ved for anden Gang at foretage en lignende Infektion som den første; hertil hører naturligvis, at vi have bemærket, hvor dybt Platintraaden ved den første Infektion blev sænket i Blandingen af Vand og Celler.

Have vi sikkret os dette vigtige Punkt, overføres hurtigt en passende Portion af vor inficerede Næringsgelatine paa de Dækglas, der skulle benyttes; disse dækkes strax hver med sin lille Klokke. Er Bordpladen, hvorpaa de ligge, kun nogenlunde vandret, behøves ingen særlig Indstilling derfor. Det er en Selvfølge, at Gelatinen stadig holdes flydende i Vandbadet, og at Cellerne deri fordeles jævnt ved Rystning. Som ovenfor fremhævet, søger man at undgaa Skumdannelse. Efterat Dækglassene have modtaget deres Næringsgelatine, hældes største Delen ud af Kolben, saa at der paa dennes Bund kun bliver et tyndt Lag tilbage. Hensigten dermed er en dobbelt: Ved at henstille denne Kolbe med sin Gelatinerest under de samme Temperaturforhold som Dækglassene, kunne vi paa en let og sikker Maade erholde Besked om, hvornaar Gelatinen paa disse er stivnet; naar det er sket i Kolben, vil det nemlig ogsaa være Tilfældet med Draaberne paa Dækglassene. Endelig skal denne Gelatinerest tjene os som en Art Reserve, hvis Kulturerne i Kamrene skulde mislykkes, hvilket dog, naar der arbejdes paa en fornuftig Maade, ikke let vil kunne ske. At de i Kolben udviklede Pletter ikke med Sikkerhed kunne tages som Renkulturer, erindres. Ved almindelig Stuevarme plejer den Næringsgelatine, hvorom Talen her bestandig er (5 % Gelatine i humlet Urt af c. 14 % Ball.), at stivne i Løbet af næppe et Kvarter; ønsker man, at det skal ske hurtigere, kan Isafkjøling

anvendes. Aarsagen til, at den flydende Gelatinedraabe strax anbringes hvilende paa Dækglasset og først, efterat den er stivnet, i hængende Stilling, er den, at man saaledes lettere uden Fare for at forstyrre Kulturen kan fæstne Dækglasset til den med Vaseline bestrøgne Rand af Ringen i det fugtige Kammer; desuden maa det vel antages, at Draaben paa den Maade bliver lidt mindre hvælvet; men nogen iøjnefaldende Forskjel er der i hvert Fald ikke. Det Samme gjælder ogsaa om de Draaber, der stivne langsomt ved Værelsets Temperatur og hurtigt ved Isafkjøling.

Saasnart Gelatinen er stivnet, gjøres Dækglasset fast til den nævnte Ring saaledes, at Kulturen nu kommer til at vende nedad. Ved forsigtigt Tryk paa de Steder af Dækglasset, der berøre Ringen, sørger man nøje for, at der finder en fuldstændig Forbindelse Sted, saa at Kamrets Rum allevegne afspærres fra Omverdenen. For at Dækglasset, hvis det berøres, ikke skal kunne glide, anbringes desuden paa to eller tre Punkter lidt smeltet Segllak.

3. Kontrollen paa Mikroskopbordet: De saaledes færdige Kamre blive nu undersøgte ved Hjælp af den tidligere omtalte svage Forstørrelse, kun i tvivlsomme Tilfælde anvendes stærkere Objektiver. De første Undersøgelser gaa ud paa at iagttage, om Cellerne overalt ligge saaledes, at særskilte Vegetationspletter kunne udvikle sig fra hver enkelt af dem; er dette Tilfældet, er hermed hele Kontrollen færdig. Ofte vil man dog finde, at der er Partier af Præparatet, som ikke yde en saadan Sikkerhed; disse maa da afgrændses. Dette kan ske ved med en fin Pensel at sætte Mærker med hvid Gummifarve ovenpaa vedkommende Dækglas. Ikke sjelden er Cellernes Fordeling en saadan, at det bliver nødvendigt at indstille paa enkelte bestemte Celler og forfølge disses Udvikling. Til denne Kontrol kan man paa Mikroskopbordet, til Højre og Venstre, anbringe Mærker, f. Ex. Krydsstreger, og paa Kamrets Objektglas tilsvarende dækkende Mærker, saaledes at man derved bestandig kan finde tilbage til det ønskede mikroskopiske Billede. Det var paa denne Maade, at jeg i Begyndelsen arbejdede; senere har Will hertil anvendt Dækglas, paa hvis ene Side han ved Hjælp af Flussyre har indætset talrige Linier, som skjære hverandre under rette Vinkler, saaledes at der fremkommer et stort Antal smaa Kvadrater med 1 Millim. Side, og af disse ere de to sammenstødende Yderrækker numererede. Disse Tal og Linier yde fortrinlige Støttepunkter. Hr. Alfred Jørgensen har mundtlig meddelt mig, at han i sine Forsøg bestandig fandt, at det var mest praktisk at indføre Tallene hver i sit Kvadrat; de tjene da ikke blot til at betegne bestemte Kvadrater, men Figurerne, som de danne, yde

tillige en god Hjælp til lettere at gjenfinde den Celle, hvis Udvikling man vil forfølge. Man kan anbringe Gelatinen saavel paa den ene som paa den anden Side, Undersøgelsen bliver dog vistnok lettest, naar det sker paa selve Indætsningen. I den nyeste Tid have vi her paa Laboratoriet ligeledes med Held benyttet Objektmærkeren[1]). Dette Apparat skrues paa Tubus i Stedet for et Objektiv, og ved Mikroskopets sædvanlige Skruebevægelse føres det derpaa forsigtig ned til Dækglasset, hvor det ved en temmelig let Berøring afsætter en farvet Ring og herved omgrændser et i Forvejen opsøgt Punkt. Ringens Diameter er 1,5 Milim.; hvis den var mindre, vilde man ved Undersøgelser som de foreliggende have endnu større Nytte deraf. Et bevægeligt Mikroskopbord med Inddelinger vil ogsaa kunne anvendes i ovennævnte Øjemed. Opgaven er i alle Tilfælde at forvisse os om, at de Vegetationspletter, vi senere benytte til vore Massekulturer, virkelig ere absolut rene Kulturer, d. v. s., hver stamme fra een eneste Celle. Det hidtil udførte Arbejde fra hele Forsøgets Begyndelse til dette Punkt plejer for en nogenlunde øvet Experimentator at tage henved 3 Timer.

Efterat vi saaledes have sikkret os Udgangspunkterne, stilles Kamrene og Chamberland-Kolben med sin Gelatinerest ind i Thermostaten ved 24—25° C Hvis man ikke har en saadan, kunne de ogsaa blive staaende i Værelset ved almindelig Stuevarme. Har man flere Kamre paa een Gang i Arbejde, er det praktisk at skyde dem ind i et dertil indrettet lille Stativ saaledes, at de i dette komme til at danne Hylder i forskjellige Højder, dog uden at berøre hverandre. Hvis der er et Mikroskop tilovers, kan man naturligvis ogsaa skrue et Kammer fast paa dets Bord og indstille paa den Celle, hvis Vegetation man ønsker at benytte; det er da meget let Skridt for Skridt at følge Udviklingen. (Se min Afhandling, II Bd., 2 Hefte, 1883, p. 61.) Det Samme opnaas ligeledes, omend med lidt mere Besvær, ved Tid efter anden at tage Kamrene ud og indstille dem efter Mærkerne. I alle de Tilfælde, hvor der er Tvivl, bør man ikke undlade at foretage en saadan Kontrol. Kontrollen vil imidlertid som Regel være let og ikke kræve stor Anstrengelse, naar man kun har arbejdet med en rigtig Fortynding og overhovedet paa rette Maade. Hvad der udmærker denne Fremgangsmaade er, at man her I n t e t o v e r l a d e r t i l T i l f æ l d e t, m e n s i k r e r s i g h v e r t S k r i d t. Det er endvidere et stort Fortrin, at vi u d e n a t f o r s t y r r e e l l e r a t u d s æ t t e v o r e V e g e t a t i o n e r f o r I n f e k t i o n u d e n f r a kunne undersøge dem saa

[1]) Klönne & Müller, Prinzenstr. 71. Berlin.

ofte, vi ønske, og ikke blot med svage, men tillige med stærke Objektiver. Herved bliver det ogsaa muligt at anstille udviklingshistoriske Iagttagelser, som ere af Vigtighed for vor Erkjendelse af de Species, hvormed vi experimentere.

Under de foran beskrevne Forhold træde tydelige, for det blotte Øje let kjendelige Vegetationspletter frem efter henved 2 Døgns Henstand, naar Gelatinekulturerne have staaet ved 24—25° C., og efter 3 Døgns, hvis de have staaet ved almindelig Stuevarme. Dette gjælder om alle de hidtil her paa Laboratoriet studerede Saccharomyceter og saccharomyceslignende Celler, Mycoderma vini, Myc. cerevisiæ, Pasteur's Torula o. s. v. Hos Saccharomyceterne og de fleste af de øvrige nævnte Former have Pletterne da nærmest Form og Størrelse som meget smaa Knappenaalshoveder og lys graagul Farve; undertiden faa de et voxagtigt Udseende, Overfladen kan være tør eller lidt glindsende; Randen viser sig ved svag Forstørrelse temmelig skarpt afgrændset eller laadden. Alle disse Differenser kunne findes hos eet og samme Species og i den samme Kultur, navnlig gjør det en Forskjel, om Pletterne have udviklet sig i tykkere eller tyndere Gelatinelag.

Temmelig tydelig forskjellige fra de foregaaende ere Pletterne af Mycoderma vini og Myc. cerevisiæ samt nogle dermed beslægtede Arter. De fuldstændigt gjennembrudte Pletter ere nemlig her lysegraa med et tørt Udseende og hindeagtigt udbredte, ofte skaalformigt fordybede. Saa længe de endnu ere dækkede af Gelatinehinde, ligne de Pletter af Saccharomyceter. Ofte er den dækkende Hinde saa tynd, at man har stor Vanskelighed ved at opdage den, og man kan da let falde i den Vildfarelse at antage, at der her findes en anden Art end den, der er tilstede i de først beskrevne Pletter.

I Gelatinelaget paa et af vore Dækglas kan der optræde 60 Vegetationspletter, og selv om kun Halvdelen af disse kan benyttes, hvilket undertiden indtræffer, kan et eneste Kammer dog altsaa give os et stort Antal Renkulturer.

4. Vegetationspletternes Renkulturer overføres i en Næringsvædske: Det er her endnu vigtigere end ved de foregaaende Arbejder at have en rolig, ren Luft og fuldstændig steriliserede Apparater. De almindelige Forberedelser ere de samme. Et Par Pincetter og de foran beskrevne Platintraadstykker holdes i Beredskab, og for saavidt man fra samme Dækglas skal benytte flere end een Plet, kræves der tillige et passende Antal smaa Klokker med tilhørende Glasplader. Til den fortsatte Dyrkning anvendes her paa Laboratoriet i Almindelighed Pasteur's tohalsede

Kolbe (1/8 Liter) med steriliseret humlet Urt (c. 14 % Ball.). I Fig. 3 ses en saadan Kolbe i formindsket Maalestok, staaende paa en Korkbrix. Det tynde Rør er i sin Spidse lukket med en Asbestprop; paa det rette Rør er anbragt en Kautschukslange, som atter lukkes med en Glasprop. Hvis Forsøget har til Opgave at give Renkultur af kun 1 Species, bruges hertil 4—5 af disse Kolber. Det store Antal har til Hensigt at sætte os i Stand til at opnaa en Art Kontrol ved at sammenligne de i Kolberne dannede Vegetationer og ligeledes at sikre os, at vi virkelig erholde en Udvikling af de udsaaede Celler. Ved Uheld kan det nemlig blandt Andet ske, at en Kolbe bliver angreben af fremmed Infektion, og ligeledes, at der slet ingen Vegetation fremkommer deri, f. Ex., hvis den ved Infektionen benyttede Platintraad var for varm.



Fig 3.

Kamrene undersøges med Mikroskopet; vi opsøge de Vegetationer, hvis Udgangspunkter vi i Forvejen have garanteret os, for at faa Sikkerhed for, at de Pletter, vi agte at benytte, hver stammer fra een Celle. Med en spids Pensel og lidt af den hvide Farve omgrændses derefter paa selve Dækglasset de udvalgte Pletter; have vi ved Forsøgets Begyndelse anvendt Klönne & Müller's Objektmærker, er dette naturligvis overflødigt.

Et af Dækglassene løsnes derpaa hurtigt fra sin Ring og lægges med Pletterne opadvendt, helst paa en mørk Bund, at de kunne træde tydeligt frem. Ved Hjælp af en af Pincetterne tages med højre Haand et Platintraadstykke, og efterat det er blevet rask ført gjennem en i Nærheden værende Gas- eller Spiritusflamme, berøres en af de udvalgte Pletter. Skal Dækglasset oftere benyttes, maa det naturligvis hver Gang strax dækkes med en af de smaa Klokker. Med venstre Haand fjærnes Kautschukslangen fra en af de Pasteurske Kolber, og i det samme Nu føres med den anden Haand det inficerede Traadstykke hen til det blottede Rørs Munding, hvori man lader det glide ned. Røret sænkes derpaa saa skraat nedad, som det kan ske, naar Vædsken ikke skal flyde ud, og føres samtidig hermed ind i Flammen for her igjen at lukkes med sin Kautschukslange. I Stedet for den omtalte Kolbe kan man ogsaa anvende Chamberland's eller Salomonsen's Model; hin er afbildet Fig. 2, p. 157; denne har en snævrere

Munding end hin og i Stedet for Glashætten et Kautschukrør, hvis øverste Parti ogsaa er fyldt med steriliseret Bomuld; i nogle Tilfælde kunne de sidstnævnte Kolber endog være at foretrække. Ved visse Lejligheder vil man ligeledes med Fordel kunne benytte Kogeflasker som hosstaaende Fig. 4, godt overbundne med et Par Lag steriliseret Filtrerpapir. Til Experimenter med Alkoholgjærsvampe er i Følge fleraarig Erfaring Pasteur's gamle Kolbe i Almindelighed den bedste. Opgaven er under alle Omstændigheder at arbejde med Sikkerhed og saa hurtigt som muligt. For ikke at bringe Luften i større Uro end nødvendigt, venter man med at ryste de inficerede Kolber, indtil de alle ere færdige. Hvad den Pasteurske Kolbe angaar, foretages dens Rystning naturligvis kun, idet man samtidig gløder det tynde bøjede Rør, da man ellers ikke har nogen Sikkerhed for, at den indtrængende Luft steriliseres. Undersøgelsen af Kamrene og Udvælgelsen af de makroskopiske Pletter samt Inficeringen af 5 Kolber med, hvad der overhovedet hører hertil, tager for een Mand c. 1 Time.


Fig. 4.

Efterat vore Kolber ogsaa ere blevne forsynede med Etiketter, stilles de helst ind i en Thermostat ved 25—28° C. I Løbet af 1—2 Døgn iagttages da en tydelig Udvikling, og efter 2 Døgns Forløb er som Regel Gjæringen i fuld Gang, og en temmelig stor Gjærmængde dannet. Dette gjælder vel navnlig om Saccharomyceterne, men ogsaa i det Hele om de fleste af de i denne Afhandling nævnte Arter; hos Mycoderma vini, Myc. cerevisiæ og flere dermed beslægtede Former optræde dog som bekjendt ikke saadanne Gjæringsfænomener.

Indtil det Punkt, hvor vi aabne Kamrene, udmærker dette Forsøg sig ved sin absolute Sikkerhed, men saasnart Aabningen finder Sted, indtræder med det Samme Usikkerheden, idet nemlig en Infektion fra vore Klæder, idet vi bevæge os, fra Luften o. s. v. da bliver mulig og saa meget desto farligere, eftersom vi endnu ikke have erholdt en Massekultur af kraftige Celler til at optage den mulige Konkurrence med fremmede Rivaler. I denne Henseende staar denne Methode tilbage for den af mig først udarbejdede (p. 154). Bedst vilde det i Følge Ovenstaaende være, kun at benytte een Plet fra hvert Dækglas.

For imidlertid ej heller her at arbejde paa Slump og i Blinde, kunne vi i den samme Tid, vi anvende til at foretage Infektionen af vore Kolber, henstille nogle aabnede Kogeflasker med vid Mun-

ding og indeholdende steriliseret Urt ligesom Kolberne, og, naar disse ere færdige, lukke Flaskerne ved Overbinding med et Par Lag steriliseret Filtrerpapir samt derefter ligeledes stille dem ind i Thermostaten ved 25—28° C. Paa denne Maade erholdes Oplysning om Luftens Indhold i det nævnte Tidsrum af saadanne Mikroorganismer, som kunne udvikle sig i den benyttede Næringsvædske. I min foran citerede Afhandling har jeg allerede vist, at denne Fare i Reglen ikke vil være stor, naar man arbejder i et renligt Værelse med rolig Luft. Senere blev der anstillet temmelig talrige Analyser paa den ovenfor beskrevne Maade; disse gave det Resultat, at der af 3 Flasker i Gjennemsnit bleve 2 inficerede. Denne Infektion bestod udelukkende af Penicillium glaucum; i intet Tilfælde optraadte Bakterier eller Gjærceller.

5. Undersøgelsen af Kolbernes Gjærvegetationer og Udvælgelsen af det eller de ønskede Species: Det blev i det Foregaaende meddelt, at vi under de angivne Dyrkningsforhold ville erholde en Massekultur efter c. 2 Døgn. For saa vidt vi ved Overførelsen af Cellerne fra Vegetationspletterne til Kolberne have undgaaet fremmed Infektion, vil enhver af disse ogsaa indeholde en Renkultur. Nogen Oplysning om dette i den beskrevne Methode svage Punkt kunne de foran omtalte Kogeflasker give os; ligeledes de i det Efterfølgende berørte Analyser. Af hver Kolbe tages nu med tilbørlig Omhu en Prøve til mikroskopisk Undersøgelse. De Kolber, hvis Celler stemme nøje overens, ville ogsaa i de fleste Tilfælde indeholde samme Species. Her maa det imidlertid erindres, at de Differenser, som under de angivne Forhold kunne optræde, i Reglen ere smaa, og at der kræves stor Øvelse for at bemærke dem. Nogen egentlig Sikkerhed giver den mikroskopiske Prøve for sig alene ikke, den bør derfor forbindes med de andre, som staa til vor Raadighed, hvad enten disse ere af botanisk eller kemisk Art. Ved Analysen af Saccharomyceterne spille, som det ses af mine Afhandlinger, Askosporernes Udviklingsgang og Hindeformerne en vigtig Rolle.

Det er saaledes blevet vist, hvorledes Renkulturer af Saccharomyceter og lignende Mikroorganismer paa en sikker og forholdsvis let Maade kunne fremstilles. Modifikationer heri ere naturligvis bestandig mulige, Hovedopgaven bliver imidlertid under alle Omstændigheder den samme. I det Foranstaaende er der meddelt de Erfaringer, som gjennem fleraarigt Arbejde ere indvundne her paa Laboratoriet. Der er lagt Hovedvægten paa, at ethvert Ar-

bejde udføres med Sikkerhed og under stadig Kontrol. Efter det Forbillede, Pasteur fremfor nogen Anden har givet i sine Værker, og som Enhver, der har besøgt hans berømte Laboratorium, der har set virkeliggjort, har jeg ønsket at indpræente, hvor vigtigt det er at arbejde med Forsigtighed og Omhu, og at enhver Forsyndelse herimod straffer sig,

Skjøndt disse Meddelelser, som allerede berørt, i Følge deres Natur nærmest ere beregnede for Begyndere, antager jeg dog, at ogsaa den mere øvede Experimentator vil kunne have nogen Nytte deraf, og for mine Elever ville de være et Erindringsord til, hvad jeg mundtlig har meddelt dem.

Der staar tilbage at give Oplysning om, hvorledes de erholdte smaa Portioner af absolut ren Gjær anvendes til at avle de store Masser, som Industrien benytter, om hvorledes man foretager Udvælgelsen af en passende Race, og om hvorledes den under Experimenterne maa behandles, for at et gunstigt Resultat strax kan opnaas. Herom maa jeg dog opsætte at give en udførlig Meddelelse til en anden Gang og indskrænke mig til at henvise til det, jeg allerede har offentliggjort om disse Spørgsmaal. Aarsagen hertil er, at nye Forbedringer i en nær Fremtid forhaabentlig ville blive gjennemførte. I Løbet af 1885 have nemlig Hr. Bryggeridirektør Kühle og jeg arbejdet paa at faa et Apparat indrettet i selve Gjæringskjælderen til en uafbrudt Fremstilling af absolut ren Gjær i det Store saaledes, at omtrent hvert 10de Døgn en stor Portion af denne Gjær føres ud i Driften. Herved vil altsaa den ældre, noget urene Gjær med korte Mellemrum blive afløst af absolut ren Gjær. Disse Forsøg ere ved denne Afhandlings Afslutning i Novbr. 1885 imidlertid ikke bragte til Ende. De Læsere, som allerede nu ønske at vide Besked om, hvorledes ren Gjær til Industribrug kan avles, henvises derfor indtil videre til de Bemærkninger derom, som findes i mine Afhandlinger, navnlig i Zeitschr. für das gesammte Brauwesen, München 1884, p. 273, og til de Oplysninger, som senere, tildels efter mine mundtlige Meddelelser, ere fremkomne i forskjellige zymotekniske Tidsskrifter, navnlig af Aubry, Bělohoubek, Jørgensen og Will.

Det var i 1883, at jeg efter en større Maalestok begyndte mine praktiske Forsøg med ren Gjær, og at jeg af Ejeren af Gl. Carlsberg's berømte Bryggerier, vort Laboratoriums Stifter, Hr. Kapt. Jacobsen, fik Tilladelse til at overføre den i Driften. Da de første Vanskeligheder vare overvundne, og Hr. Jacobsen havde overbevist

sig om, at der her var Tale om et virkeligt Fremskridt, støttede han det paa en kraftig Maade ved sin store, almindelig anerkjendte Autoritet. Uagtet den Mistillid, hvormed de fleste, endog intelligente Bryggere modtoge den rene Gjær, blev der dog i forholdsvis kort Tid gjort Forsøg dermed i de fleste ølbryggende Lande, og for Øjeblikket er den ikke blot indført som et fast Led i Driften i alle de ansete danske Bryggerier, men tillige i et meget stort Antal af Udlandets. Æren for, at Sagen, trods den kraftige Modstand, der blev rejst derimod fra Forsøgsstationen i den kongl. Landbohøjskole i Berlin, saa hurtigt fandt Udbredelse i de for Fabrikationen af undergjæret Øl mest berømte Lande, Tydskland og Østerrig, skyldes Aubry's Laboratorium i München.

VI.

Om Hindedannelsen hos Slægten Saccharomyces.

(Første Afhandling. Hertil Tavle I—VIII.)

Almindelige Iagttagelser.

Det er en bekjendt Sag, at Øl, Vin og andre lignende Vædsker i Almindelighed hurtigt bedækkes med en Hinde, naar de i aabne Glas udsættes for Luftens direkte Paavirkning. Disse Hinder kunne være dannede af forskjellige Mikroorganismer: Bakterier, Saccharomyceter, saccharomyceslignende Gjærceller og Skimmelarter. Snart har en, snart en anden Art Overhaand, og derefter modtager da ogsaa Hinden strax et mere eller mindre ejendommeligt Præg.

De Hindedannelser, der navnlig have tildraget sig Opmærksomhed, ere dem, der skyldes de saccharomyceslignende Celler, som man i Systemet har tillagt Navnet Sacch. Mycoderma (Mycoderma vini, Myc. cerevisiæ). Man er efterhaanden bleven vant til at tale om dem som om bekjendte Størrelser paa samme Maade, som det er sket med Sacch. cerevisiæ og med saa mange andre af Systemets Mikroorganismer, skjøndt vi i Virkeligheden ikke kunne knytte nogen bestemt Forestilling til Navnet. I den videnskabelige Strid, som for 8 Aar siden fandt Sted imellem Grawitz og Reess angaaende Spørgsmaalet om, hvorvidt den Svamp, der giver Trøske, er identisk med Sacch. Mycoderma eller ej, traadte det allerede temmelig tydeligt frem, at der under dette systematiske Navn i Virkeligheden skjules flere Species, og at det ikke betyder det samme hos de forskjellige Forfattere[1]).

---

[1]) I den af Plaut for kort Tid siden udgivne Afhandling om Trøskesvampen udtales den Anskuelse, at den vistnok er den samme Art som den, jeg har behandlet under Navnet Monilia candida; se p. 170.

I de Afhandlinger om Bakterier, Skimmel- og Gjærsvampe, som jeg siden 1878 har offentliggjort i dette Tidsskrift og andensteds, er der efterhaanden behandlet et stort Antal hindedannende Former og navnlig givet Exempler paa en Række mere og mindre fra hverandre afvigende Species med saccharomyceslignende Celler, der alle danne lignende Hinder som Sacch. Mycoderma, og hvoraf idetmindste flere godt kunne bestemmes med dette Artsnavn. Ingen af disse Species udvikler imidlertid de for Slægten Saccharomyces saa karakteristiske Endosporer og kunne altsaa ikke henregnes til denne. Ved fornylig atter at gjennemgaa mine tidligere Undersøgelser i den Retning, fik jeg paany dette bekræftet. Særligt havde jeg min Opmærksomhed henvendt paa de hindedannende Former, der med saa stor Lethed og bestandig optræde paa Øl, og som fremfor alle andre synes at være underforstaaede, naar Species-Navnet, Sacch. Mycoderma, nævnes; men, som sagt, ved ingen af de Dyrkningsmaader, ved hvilke Endosporer hos andre Gjærceller optraadte, viste saadanne sig her. De Forskere, der som J. de Seynes, Reess, Cienkowski og andre angive at have erholdt den omtalte Sporeudvikling hos Sacch. Mycoderma ved de sædvanlige, ogsaa af mig prøvede Dyrkningsmaader, maa følgelig enten have havt en Art for sig, som jeg uagtet fleraarig og omfattende Søgen ikke har truffet, eller, hvad der ogsaa kan tænkes, arbejdet med en Indblanding af virkelige Saccharomyceter. Naar man læser Cienkowski's Afhandling om Mycoderma vini, ledes Tanken netop hen paa den sidst omtalte Mulighed; thi han udtaler det ligefrem som højst sandsynligt, at Sacch. apiculatus, Sacch. Pastorianus o. s. v. kun ere Udviklingsformer af den ovennævnte Art. Engel, som ligeledes mener at have iagttaget Endosporer hos denne Art, giver nogle Afbildninger deraf, men disse vise nærmest hen til, at han er bleven skuffet af de stærkt lysbrydende, fedtagtige Legemer, der ere saa hyppige netop hos de omtalte hindedannende Gjærceller. Mine Sacch. Mycoderma-Celler i Hinder paa Øl stemme ellers nøje overens med Reess's Beskrivelse. De have stærkt udviklede Vakuoler, ere fattige paa Plasma og gjøre paa den øvede Mikroskopiker Indtryk af, at Sporedannelse hos dem er umulig[1]).

[1]) Det kunde maaske være værd at tage Sagen fra en anden Side, nemlig ved at dyrke vor Art som Bundgjær igjennem talrige Generationer og da forsøge, om den ikke herved skulde være bleven istand til at danne Endosporer. Sikkert er det, at den, naar den tvinges til at vegetere som Bundgjær, bliver mere plasmafyldt og overhovedet faar større Lighed med de Gjærsvampe, om hvilke vi nu med Sikkerhed vide, at de i deres Indre kunne udvikle Sporer.

Disse og maaske alle hidtil i Literaturen omhandlede hindedannende Gjærceller kunne vi følgelig ikke henregne til Slægten Saccharomyces. De gamle Navne Mycoderma cerevisiæ og Mycoderma vini ville derfor egentlig være heldigere end det ofte anførte, især da Eddikesyrebakterierne, der ogsaa tidligere paa Grund af deres Hindedannelse bare Navnet Mycoderma, nu have faaet det ombyttet med andre[1]).

De fleste af dem og især de Former, hvorpaa der vel navnlig er tænkt ved Navnet Sacch. Mycoderma, udmærke sig derved, at de let og hurtigt, ligesom uden Forberedelse, kunne danne Hinder paa flere organiske Vædsker, navnlig naar disse ere sure og spirituøse. Der synes ikke at gaa nogen Gjæring forud derfor, dog mangle Cellerne ikke Gjæringsevne. Det angives saaledes i Literaturen, at de, naar de ere neddykkede i en sukkerholdig Næringsvædske, kunne give en svag Alkoholgjæring, og at de paa Overfladen af vinøse Vædsker fremkalde en Oxydationsgjæring, hvorved i nogle Tilfælde Alkohol omdannes til Kulsyre og Vand, i andre til Eddikesyre; de skulle ogsaa kunne danne Fedtsyrer, derefter oxydere disse og frembringe Ætherarter (Schulz). Hinderne have idetmindste paa Øl og Urt et tørt, graaladent Udseende; i Begyndelsen se de nærmest ud som et fint Støv, senere blive de tykkere, oftest foldede og erholde en lysere Farve. Imellem Cellerne findes rigelig Luftindblanding, og ved at udsaa dem paa ny Næringsvædske viser det sig, at de her atter holde sig paa Overfladen uden at synke til Bunds.

Hinder, der have megen Lighed med de foregaaende, dannes ogsaa af andre saccharomyceslignende Arter, f. Ex. af den i min Afhandling om Pasteur's Torula p. 89 og 90 beskrevne Form. Foldninger optræde dog ikke i denne Arts Hinder. Mere forskjellige derfra ere de af Chalara Mycoderma og Monilia candida dannede Hinder; hos hin have de nemlig et klæbrigt, sejgt, lidt glindsende Udseende, hos denne frembyde de i andre Retninger Differenser; disse fortjene en nærmere Omtale.

Ved Navnet Monilia candida betegner jeg en Skimmelsvamp, der i visse Udviklingsstadier optræder med saccharomyceslignende

---

[1]) De ovenfor berørte hindedannende Gjærceller fortjene aabenbart et nøjere Studium saavel i theoretisk som ogsaa i praktisk Retning. I den interessante Afhandling, »Ueber den Einfluss der Hefe auf die Qualität des Bieres« (Böhm. Bierbrauer, Prag 1885) af Prof. Bělohoubek fremhæves blandt andet p. 448, hvilke betydelige Ølmasser, der aarligt fordærves af Mycod. cerevisiæ.

Celler, hvilke ere særligt mærkværdige derved, at de uden foregaaende Inversion fremkalde Alkoholgjæring i en Saccharose-Opløsning, altsaa forgjære denne Sukkerart direkte. Nogle Meddelelser derom har jeg offentliggjort i Fasbender's zymotekniske Tidsskrift 1883 og i Berichte der deutschen botan. Gesellsch. 1884. Her skal kun tales om deres Hindedannelse. Udsaas unge, kraftige Celler af denne Art i en gjæringsdygtig Næringsvædske, f. Ex. Ølurt, ved en ikke for lav Temperatur, saa fremkalde de deri hurtigt en livlig Gjæring med Overgjæringsfænomener, og medens Skumblærer stige op, dannes der allerede Hinder paa Overfladen af disse. Efterat Skumudviklingen er standset, breder Hinden sig efterhaanden ud over hele Overfladen, de store hindeklædte Luftblærer briste lidt efter lidt; herved fremkommer der tidt Foldninger, dog ikke af det Udseende som i de typiske Mycoderma cerevisiæ-Hinder. I Modsætning til, hvad der var Tilfældet hos sidstnævnte, gaar altsaa her en tydelig Gjæring forud for Hindedannelsen. Medens Mycoderma cerevisiæ-Hinden under lignende Ernæringsforhold strax dannes af de paa Overfladen udsaaede Celler, maa vi med Hensyn til Monilia candida nærmest tænke os Forholdet saaledes, at dens Celler alle synke til Bunds i vore Kolber for her først som Bundgjær at formere sig, fremkalde Gjæring og for da endelig med Kulsyreblærerne atter at stige op til Overfladen, hvor Hinden derpaa udvikles med stor Hurtighed. I lignende Forsøg, men hvor Udsæden var gamle Celler, dannedes der paa Vædskens Overflade tørre, graa Hindepletter, førend der endnu havde vist sig makroskopiske Tegn til Gjæring, og benyttes i Stedet for Ølurt en spirituøs, udgjæret Vædske som Lagerøl, bliver Forholdet ligeledes et andet. En Kultur i en Pasteursk Kolbe (Fig. 3, p. 163) med steriliseret Lagerøl gav nemlig en yderst ringe Formering og ingen Gjæring; paa Vædskens Overflade dannedes der kun en meget tynd, støvagtig Hinde. Ligesom Oidium lactis og flere andre Skimmelsvampe, der leve paa Vædskers Overflade, kan ogsaa denne under passende Ernæringsforhold udvikle et hvidmelet og laaddent Lag, aldeles forskjelligt fra alle de foran omtalte Hinder.

Hinder af en noget anden Art end de hidtil omtalte optræde hos flere af de talrige Gjærsvampe, der af Pasteur kaldes Torula, endvidere hos Sacch. apiculatus og hos alle ægte Saccharomyceter. Hindedannelsen er overhovedet et meget almindeligt Fænomen i Mikroorganismernes Verden og findes i samme Grad hos Bakterier som hos de egentlige Svampe og hos Former, henhørende til forskjellige Afdelinger i

Systemet. Af de netop nævnte Gjærsvampes og ægte Saccharomyceter's Hindedannelser gives nedenfor en Beskrivelse; den er vel affattet efter Iagttagelser over Saccharomyceter, men passer, saa vidt mine Undersøgelser gaa, i alt Væsentligt ogsaa paa de andre Former.

Lade vi Kulturer af Saccharomyceter i steriliseret Urt henstaa uforstyrrede en kortere eller længere Tid ved almindelig Stuevarme, viser der sig efterhaanden smaa Gjærpletter saavel i Vædskens Rand op mod Glassets Væg som paa selve dens Overflade; ofte træde de sammen til Linier, Grupper og netformede Forgreninger; efterhaanden som de blive større, kunne de voxe til anselige Øer, hvis opadvendte Del er temmelig flad og den nedadvendte halvkugle- eller kegleformet. Delvis sammensmeltede og altsaa kun løst forbundne Øer ere hyppige. Dyppes en Glasstang ned i en saadan Masse, da aflejres paa den de enkelte Øer hver for sig, og man kan saaledes fiske dem op til nærmere Undersøgelse. Ved at voxe kunne et større Antal Øer smelte sammen og tilsidst dække hele Overfladen med en sammenhængende Hinde, der ovenover Vædsken paa selve Glassets Væg ofte fortsættes af et helt Gjærbælte, en Gjærringdannelse. De smaa Pletter, som vi i Begyndelsen iagttage, stamme rimeligvis i Reglen hver fra een eller i det Højeste fra nogle faa Celler, som ved Kulsyreudviklingen ere blevne løftede op fra Bundgjæren. Den egentlige Hindedannelse optræder dog først, efterat Hovedgjæringen er standset, og det derved frembragte Skum forsvundet. Svagt udviklede Pletter kan man imidlertid iagttage paa et tidligere Stadium, medens der endnu finder en tydelig Gjæring Sted, og ret talrige Kulsyreblærer stige op. Der er Kolber, i hvilke Hindedannelsen begynder ringformig langs Vædskens Rand, andre, i hvilke man tydeligt kan se, at Udviklingen netop tager fat i Overfladens Midte og herfra skyder ud til alle Sider.

Under de angivne Forhold finder der kun en svag Udvikling Sted hos Sacch. apiculatus og hos flere af de saakaldte Torula-Former, en kraftig Udvikling derimod hos alle ægte Saccharomyceter. Have vore Kulturer af disse staaet i Ro i flere Uger, uden at blive rystede, se vi som Regel, at Vædskens Overflade er mere eller mindre fuldstændig dækket med en tyk Hinde og omkrandset af et bredt Gjærbælte. Tidt findes i dette en tyk Gjærmasse, i Almindelighed med et lyst gulgraat, slimet Udseende; dette gjælder ligeledes om Hinden. Undtagelsesvis kan den dog ogsaa se mere tør ud og herved faa nogen ydre Lighed med de foran omtalte Hinder af Mycoderma cerevisiæ. Den er i Almindelighed glat, sjældnere

ujævn, ligesom besat med smaa Tuer; i sidste Tilfælde var den ofte tillige bruskagtig. Idet Hinde og Gjærring blive tykkere, vise de sig samtidig med en lysere Farve. Betragte vi gamle og tykke Saccharomyces-Hinder, se vi, navnlig hvis vedkommende Kolbe rystes, at der løsrives større og mindre Trevler deraf, som derpaa synke til Bunds, hvor et helt Lag saaledes efterhaanden kan ophobes. Imidlertid kan den tilbageblevne mere eller mindre iturevne Hinde atter reparere sig selv og efterhaanden paany tillukke Hullerne; herved sker det da ikke sjælden, at den bliver plettet eller marmoreret med tykkere, lysere Partier, de ældste Dele, og tyndere, mørkere, de sidst dannede. De tykke, slimede Lappers og Klumpers Ydre minde os meget om Zoogløadannelsen hos Bakterierne.

Iblandt de talrige Saccharomyces-Arter, hvis Hinder jeg har studeret, høre ogsaa de sex, hvorom jeg i tidligere Afhandlinger har meddelt en Række andre Undersøgelser. Det er fornemlig disse Arter, jeg har havt for Øje i den foranstaaende Beskrivelse.

Foretage vi mikroskopiske Undersøgelser af disses Hinder, erfare vi snart, at Vegetationerne deri kunne være temmelig forskjellige, endog for een og samme Art; Fig. 3, Tavle III—VIII, vise os dette. I disse Afbildninger er fremstillet sex Grupper af Celler, hver tilhørende sin Art og alle stammende fra Hinder i flere Maaneder gamle Kulturer i Pasteurske tohalsede Kolber med steriliseret Humleurt (c. 14 % Ball.) ved almindelig Stuevarme. Udsædens Celler ere aftegnede paa Tavlerne I—II; disses sex Figurgrupper vise os Vegetationer af vore sex Arter, saaledes som de ved almindelig Stuevarme optræde i ung Bundgjær i de ovenfor omtalte Urt-Kulturer, naar Næringsvædsken med korte Mellemrum flere Gange er bleven fornyet. Benyttes denne Gjær til Infektion af lignende Kolber med Urt, men som derpaa henstilles et Døgn ved c. 26° C., da erholdes Bundgjær, hvis Celler have et lignende Udseende og fremvise samme Billede. Figurerne paa Tavle I og II vise os, kort sagt, kraftige, unge Vegetationer i almindelig Bundgjær, saaledes som de bleve benyttede til at inficere de Kolber, hvori senere Hinderne udviklede sig. En Beskrivelse af de sex paagjældende Arter findes i nærværende Tidsskrift, 2 Bind, 2 Hefte, p. 67—71. Vi gaa derefter over til nærmere at betragte de omtalte Hinder.

Fig. 3, Tavle III, forestiller den Art, som er betegnet med det foreløbige Navn Sacch. cerevisiæ I. Som Figuren viser,

ligge nogle Celler enkeltvis, medens andre ere forbundne i mere eller mindre grenede Kolonier; disses Led kunne være ovale, kort pølsedannede eller meget langstrakte; i sidste Tilfælde kunne Kolonierne faa en flygtig Lighed med et Mycelium. Nogle af Cellerne ligne Udsædens (Fig. 1, Tavle I), men i Almindelighed have de antaget en mere langstrakt og ofte tillige en uregelmæssig Form. Knopperne komme ogsaa i flere Tilfælde frem paa en anden Maade end hos almindelig Bundgjær. Det mest paafaldende er dog, at vi her have en Art, hvis sædvanlige Bundgjærform efter det hidtil gængse System maa kaldes for en typisk Sacch. cerevisiæ, men hvis Hindeform gaar aldeles bort derfra og antager Skikkelse som en stærkt udpræget Sacch. Pastorianus. Saavel om denne Art som om de følgende maa det fremhæves, at en omhyggelig Betragtning af de citerede Afbildninger bedre end al Beskrivelse giver en Forestilling om Forholdene.

I Fig. 3, Tavle IV, er fremstillet en tilsvarende Vegetation af Sacch. Pastorianus I. Ogsaa heri finde vi Celler af samme Form som Udsædens (Fig. 2, Tavle I); de ere dog gjennemgaaende noget mindre end dennes; imellem dem findes mere langstrakte og barokke, undertiden næsten traadformede; Kolonier ere ikke saa fremtrædende som hos foregaaende Art.

Fig. 3, Tavle V, forestiller Sacch. Pastorianus II. Bemærkningerne for den ovenstaaende Art gjælde ogsaa i det Hele her. (Sammenlign den anførte Figur med Afbildningen af Udsædens Celler, Fig. 3, Tavle I).

Den tredie Art af denne Gruppe, Sacch. Pastorianus III, er afbildet i Fig. 3, Tavle VI. Traadformede og langstrakt pølsedannede Celler, tidt i grenede, sammenfiltrede Kolonier, ere her meget fremtrædende; flere af Cellerne have større Lighed med Bakterieformer end med Saccharomyceter. Der er overhovedet foregaaet en meget iøjnefaldende Omdannelse. (Sammenlign hermed Udsæden, Fig. 1, Tavle II). Ved Siden heraf findes dog ogsaa som sædvanlig Celler som Udsædens.

I Fig. 3, Tavle VII, ses Exempler paa en lignende Vegetation af Sacch. ellipsoideus I. Udviklingen af Kolonier med korte og langstrakt pølsedannede Led ere her det mest Ejendommelige; Grenene ere ofte krandsstillede eller modsatte. Barokke og meget langstrakte, tynde Celler iagttages ogsaa, desuden Celler af samme Form som Udsædens (Fig. 2, Tavle II). Meget iøjnefaldende er den Omdannelse, der har fundet Sted: den ved sine ovale Celler i Bundgjærformen typiske Sacch. ellipsoideus er i sin Hindeform bleven til en af Systemets Sacch. Pastorianus.

En hovedsagelig i samme Retning gaaende Formforandring viser den sidste af mine sex Arter, Sacch. ellipsoideus II. Udsædens Celler ere fremstillede i Fig. 3, Tavle II, Hindens i Fig. 3, Tavle VIII.

I alle vore Fig. 3 paa Tavlerne III—VIII finde vi Exempler paa uregelmæssige Former ligesom ogsaa paa det Forhold, at en Modercelle har udskudt en Krands eller Busk af mere eller mindre tæt ved hverandre siddende Knopper. Denne Knopskydningsform er ikke sjælden hos nogen af de sex Arter, og det er kun en Tilfældighed, at der er givet saa faa Afbildninger deraf. Den minder meget om den Form, Reess opfører som et selvstændigt Species under Navn af Sacch. conglomeratus, og er maaske identisk dermed; jeg har i ethvert Fald uagtet flittig Søgen i de Aar, jeg har underkastet Saccharomyceterne et særligt Studium, ikke truffet paa andre, som kunde henføres dertil. En kraftig Udvikling af langstrakte Celler, enkeltvis og i Kolonier, traadte kun frem i de ældre Kulturer, og Forholdet imellem denne Udvikling og Udviklingen af ovale og kort pølsedannede Celler var overhovedet vexlende; snart fandtes Overvægten paa den ene, snart paa den anden Side. Figurerne bleve tegnede efter talrige Kulturer og derefter sammenlignede med endnu flere; de indeholde de vigtigste af de Former, der optraadte. I Gjærringdannelserne iagttoges ingen andre end de, der ogsaa fandtes i vedkommende Arts Hinder, dog kunde der i samme Kolbe være tydelig Forskjel paa Hindens og Gjærringens Vegetationer. De yngre Hinder bestode regelmæssig af Celler med et kraftigt Udseende; de gamle Hinders havde derimod tydeligt fremtrædende Væg og indeholdt stærkt lysbrydende Korn og uregelmæssige Legemer. Saadanne Celler havde tillige undertiden et smudsigt gulladent Udseende.

Sammenligne vi de sex undersøgte Hindeformer, saa finde vi, at de alle have udviklet mere langstrakte Celler og som Regel tillige mere sammensatte Kolonier, end der fandtes i den tilsvarende Udsæd. Stærkest træder dette frem hos Sacch. cerevisiæ I, Sacch. ellipsoideus I og Sacch. ellipsoideus II, hvis Hindeformer som anført anvise disse tre Arter en helt anden Arts Plads end deres Bundgjærformer, et nyt Bevis for det Uholdbare i de Principer, hvorefter Reess's System er opført. Mærkværdig ved sin Udvikling af meget langstrakte, ofte traadformede og bakterielignende Celler er Sacch. Pastorianus III. Sacch. Pastorianus I og Sacch. Pastorianus II frembyde størst Lighed med hinanden; paa samme Maade er der stor Overensstemmelse imellem Sacch. ellipsoideus I og Sacch. ellipsoideus II. Trods Ligheden imellem vore sex Species,

træder der dog ved nøjere Betragtning Differenser frem; de ere imidlertid af en saa vanskelig og fin Art, at der egentlig ikke kan gives andet Udtryk derfor, end det, Figurgrupperne vise, og tages de enkelte Celler for sig, svinde alle Grændserne. Disse Antydninger havde, i hvor dunkle de end vare, dog Betydning for mig. I mine Undersøgelser over Mikroorganismerne er der nemlig fra deres Begyndelse bestandig gaaet en Bestræbelse efter at finde Karakterer hos de Former, hvormed Experimenterne bleve anstillede, for saaledes at erholde faste Udgangspunkter. En af Hovedopgaverne for min Forsken blev saaledes det fundamentale og i vor Tid saa brændende Spørgsmaal om Species og disses Begrændsning, og herved erholdt mine Arbejder deres fremtrædende botaniske Præg. Det var ligeledes fornemlig fra dette Synspunkt, at de foreliggende Undersøgelser bleve begyndte. Efterat de ovenfor omtalte Iagttagelser vare afsluttede, kunde Spørgsmaalet gives en bestemtere Form og underkastes en experimentel Behandling. Det Vigtigste herom meddeles i det følgende Afsnit. Som sædvanlig har der under Hovedarbejdet aabnet sig nye Sideveje; og om disse gives ligeledes sammesteds nogle Oplysninger.

Experimenter.

Saa vidt vor Viden for Øjeblikket gaar, maa vi antage, at det er en fælleds Betingelse for alle de i det foregaaende Afsnit omhandlede Hindedannelser, at vedkommende Mikroorganisme maa have direkte Adgang til atmosfærisk Luft, og at der, for at en kraftig Udvikling i den nævnte Retning skal indtræde, maa være en rigelig Tilførsel deraf. Forsøg med Saccharomyceter bekræfte dette. Tages f. Ex. en Række Pasteurske Kolber af nøjagtigt samme Beskaffenhed, hver indeholdende en ligestor Portion af den samme steriliserede Urt, og inficeres disse med en Gjærart, der er villig til at udvikle Hinde, f. Ex. Sacch. ellipsoideus II, da vil man, hvis Halvdelen af disse aldeles ensartede Kolber anbringes saaledes i Vand med deres bøjede Rør, at en Afspærring finder Sted, og at den under Gjæringen udviklede Kulsyre som Bobler maa bane sig Vej op igjennem Vandet, finde, at der efter nogen Tids Forløb vel optræder en Hindedannelse, men at den udvikler sig langsommere og langtfra saa kraftigt som i de Kolber, der ikke bleve afspærrede. Under forresten lige Forhold erholder man

ligeledes hurtigere Hindeudvikling i Chamberland-Kolberne (Fig. 2 p. 157) end i de Pasteurske, og endnu hurtigere og kraftigere, naar der anvendes de p. 164 afbildede Kogeflasker, overbundne med to Lag steriliseret almindeligt Filtrerpapir. Da det tilmed er let at tage Prøver op fra ethvertsomhelst Punkt af de i disse Flasker dannede Hinder uden i højere Grad at forstyrre dem, bleve de fortrinsvis benyttede af mig til mine Forsøg, og naar intet Andet siges, er der bestandig tænkt paa dem. Hver rummede 142 og indeholdt 70 Kub.-Cent. steriliseret klar, humlet Urt (c. 14 °/o Ball.), som den almindelig forefindes i Undergjæringsbryggerier. Det er den Næringsvædske, jeg hyppigst har benyttet i mine gjæringsfysiologiske Experimenter, og som saa ofte er omtalt i mine Afhandlinger. Udsæden blev forberedet paa samme Maade som til mine Undersøgelser over Askosporedannelsen og bestod af de samme sex Arter, hvilke der ere omtalte. Efterat vedkommende Celler i nogen Tid vare blevne dyrkede i den omtalte Ølurt ved almindelig Stuevarme, bleve unge, kraftige Celler herfra overførte i ny Urt af samme Beskaffenhed som den tidligere og saaledes dyrkede i henved 1 Døgn ved 26—27° C. Den gjærende Vædske blev derpaa fjernet og til Gjærbundfaldet sat en lignende Portion af den ovennævnte Urt, hvorpaa en Omrystning foretoges for at erholde en nogenlunde jævn Fordeling af Cellerne. Af denne Blanding udsaaedes en Draabe i hver af de beskrevne Flasker. At alle disse Arbejder bleve udførte saaledes, at en fremmed Infektion blev undgaaet, er en Selvfølge.

Forinden vi gaa videre, vil det være rigtigt at kaste et Blik paa de Celler, der dannede Udgangspunkterne for Experimenterne; de ere afbildede paa Tavle I og II i den Orden, hvori Arterne saavel i denne som i mine tidligere Afhandlinger behandles.

Fig. 1, Tavle I, forestiller Sacch. cerevisiæ I; den bestaar fortrinsvis af store, runde og ovale Celler, egentlig langstrakte optraadte ikke.

Cellerne af Sacch. Pastorianus I (Fig. 2 Tavle I) have i det Hele et andet Udseende; de ere nemlig hyppigst langstrakt pølsedannede, herimellem findes dog ogsaa, om end kun som underordnet Indblanding, større og mindre ovale og runde Celler, hvoraf mange ligne foranstaaende Art. Hvad der er sagt om Sacch. Pastorianus I, gjælder ogsaa om de to andre Arter af samme Gruppe, Sacch. Pastorianus II (Fig. 3, Tavle I) og Sacch. Pastorianus III (Fig. 1, Tavle II). Under de angivne Dyrkningsforsøg stemme de overhovedet alle tre væsentlig overens. Differenserne ere, som et Blik paa Afbildningerne viser, i hvert Fald meget ringe.

Sacch. ellipsoideus I (Fig. 2, Tavle II) slutter sig, hvad Formen angaar, nær til Sacch. ellipsoideus II (Fig. 3, Tavle II); begge disse Arter udmærke sig ved et overvejende Antal ovale og runde Celler; pølsedannede Celler forekomme dog ogsaa hos begge, men i Reglen næppe saa talrige, som de to Afbildninger vise.

Nogle af de foregaaende Arter adskille sig endvidere fra hverandre ved deres forskjellige Lysbrydning. Det er imidlertid en Karakter af en saadan Art, som kun den, der ved daglig Øvelse under saadanne Studier har udviklet sit Øje, vil kunne bemærke. De Forsøg, der ere blevne anstillede her paa Laboratoriet for at finde et videnskabeligt Udtryk derfor, have endnu ikke ført til noget Resultat.

Angaaende Udmaalingerne viste det sig, at der herved kun var temmelig ringe Oplysning at erholde: Den største Diameter af Sacch. cerevisiæ I var 11—5, hyppigst 8—6 Mikromillim. Hos de tre Arter af Gruppen Pastorianus var største Dimension 17—$2^1/_2$, hyppig 8—7 Mikromillim., hos Sacch. ellipsoideus I 13—$2^1/_2$, hyppig 7—6 Mikromillim., og hos Sacch. ellipsoideus II 11—3, hyppig 8—7 Mikromillim.

Sammenligne vi til Slutning de paa Tavle I og II fremstillede 6 Grupper af Celler, saa finde vi altsaa, at vi med temmelig Lethed kunne skjelne imellem 3 Afdelinger, hvoraf den ene omfatter Sacch. cerevisiæ I, den anden de 3 Arter af Gruppen Sacch. Pastorianus, og den tredie de 2 Arter af Gruppen Sacch. ellipsoideus. Dette gjælder dog kun, naar Talen er om Renkulturer og kun under de foran nævnte Livsforhold.

Da de saaledes under de samme ydre Faktorer gjennem talløse Generationer i Aarevis dyrkede Arter bestandig have vist de samme Differenser, tyder dette paa en Forskjellighed hos Cellerne selv, paa Noget disse iboende. Vexle Livsbetingelserne, blive ogsaa, som vi i det Følgende skulle se, Forholdene anderledes. Jeg har allerede i tidligere Arbejder paavist ydre Faktorers Indflydelse paa Udviklingen af Cellernes Form[1]); vi skulle nu paa et nyt Omraade stifte nærmere Bekjendtskab med det rige Spil,

---

[1]) Se navnlig min Afhandling: Om Askosporedannelsen, p. 79. Det vises her, hvorledes Sacch. cerevisiæ (Øl-Undergjærform), efter en vis Behandling og derpaa følgende Dyrkning ved højere og lavere Varmegrader, ved 27° C. udvikler Celler med det normale, typiske Udseende, men ved $7^1/_2$° C. derimod sammenfiltrede Kolonier med mycelieagtige Forgreninger.

den store Foranderlighed, som her kan optræde, en Foranderlighed saa stor, at Alt synes at være flydende. For den opmærksomme Iagttager vise Grændserne sig dog, det Faste i det Omskiftende. Vore Hovedbestræbelser skulle gaa ud paa at udfinde Lovene i den Strøm af Metamorfoser, som Experimenterne sætte i Gang.

Efterat de beskrevne Rendyrkninger af de sex Arter vare blevne udsaaede hver i sin Flaske med Urt, og Flaskerne atter tilbørlig overbundne med Filtrerpapir, bleve de strax stillede ind i Thermostaten ved en Række forskjellige Temperaturer. Der var sørget for, at Flaskerne kort før Infektionen havde den ønskede Varmegrad. Som et fælles Udgangspunkt ved den mikroskopiske Undersøgelse bleve bestandig de første Udviklingstrin af Hindedannelserne benyttede, saasnart de vare saa tydelige, at de med Sikkerhed kunde iagttages med det blotte Øje. De herfra stammende Vegetationer ere afbildede i Figurerne 1 og 2 paa Tavlerne III—VIII. Ogsaa den ved lang Henstand fremkomne Vegetation blev studeret, og herom gives ligeledes paa sit Sted Oplysning. Med hver Art blev der anstillet talrige Forsøg. Nedenfor meddeles Resultaterne.

Sacch. cerevisiæ I.

(Tavle III, Fig. 1—3.)

Ved 38° C. optraadte ingen Hindedannelse.
- 33—34° C. fandtes efter 9—18 Døgn svagt udviklede Hindepletter med en Vegetation som . . . . . . Fig. 2.
- 26—28° C. . . . . . efter 7—11 Døgn - . . . . . . Fig. 2.
- 20—22° C. . . . . . - 7—10 Døgn - . . . . . . Fig. 2.
- 13—15° C. . . . . . - 15—30 Døgn - . . . . . . Fig. 1.
- 6—7° C. . . . . . - 2—3 Mndr. - . . . . . . Fig. 1.
- 5° C. optraadte ingen Hindedannelse.

Sacch. Pastorianus I.

(Tavle IV, Fig. 1—3.)

Ved 34° C. optraadte ingen Hindedannelse.
- 26—28° C. fandtes efter 7—10 Døgn svagt udviklede Hindepletter med en Vegetation som . . . . . . Fig. 1.
- 20—22° C. . . . . . efter 8—15 Døgn - . . . . . . Fig. 1.
- 13—15° C. . . . . . - 15—30 Døgn - . . . . . . Fig. 2.
- 6—7° C. . . . . . - 1—2 Mndr. - . . . . . . Fig. 2.
- 3—5° C. . . . . . - 5—6 Mndr. - . . . . . . Fig. 2, dog uden de store Kolonier.
- 2—3° C. optraadte ingen Hindedannelse.

Sacch. Pastorianus II.

(Tavle V, Fig. 1—3.)

Ved 34° C. optraadte ingen Hindedannelse.
- 26—28° C. fandtes efter 7—10 Døgn svagt udviklede Hindepletter med en Vegetation som . . . . . . Fig. 1.
- 20—22° C. . . . . . efter 8—15 Døgn - . . . . . . Fig. 1.
- 13—15° C. . . . . . - 10—25 Døgn - . . . . . . Fig. 2.
- 6—7° C. . . . . . - 1—2 Mndr. - . . . . . . Fig. 2.
- 3—5° C. . . . . . - 5—6 Mndr. - . . . . . . Fig. 2.
- 2—3° C. optraadte ingen Hindedannelse.

Sacch. Pastorianus III.

(Tavle VI, Fig. 1—3.)

Ved 34° C. optraadte ingen Hindedannelse.
- 26—28° C. fandtes efter 7—10 Døgn svagt udviklede Hindepletter med en Vegetation som . . . . . . Fig. 1.
- 20—22° C. . . . . . efter 9—12 Døgn - . . . . . . Fig. 1.
- 13—15° C. . . . . . - 10—20 Døgn - . . . . . . Fig. 2.
- 6—7° C. . . . . . - 1—2 Mndr. - . . . . . . Fig. 2.
- 3—5° C. . . . . . - 5—6 Mndr. - . . . . . . Fig. 2, dog uden de stærkt udviklede Kolonier.
- 2—3° C. optraadte ingen Hindedannelse.

Sacch. ellipsoideus I.

(Tavle VII. Fig. 1—3.)

Ved 38° C. optraadte ingen Hindedannelse.
- 33—34° C. fandtes efter 8—12 Døgn svagt udviklede Hindepletter med en Vegetation som . . . . . . Fig. 1.
- 26—28° C. . . . . . efter 9—16 Døgn - . . . . . . Fig. 1.
- 20—22° C. . . . . . - 10—17 Døgn - . . . . . . Fig. 1, dog i Reglen med Tilløb til Fig. 2.
- 13—15° C. . . . . . - 15—30 Døgn - . . . . . . Fig. 2.
- 6—7° C. . . . . . - 2—3 Mndr. - . . . . . . Fig. 1.
- 5° C. optraadte ingen Hindedannelse.

Sacch. ellipsoideus II.

(Tavle VIII, Fig. 1—3.)

Ved 40° C. optraadte ingen Hindedannelse.
- 36—38° C. fandtes efter 8—12 Døgn svagt udviklede Hindepletter med en Vegetation som . . . . . . Fig. 1.
- 33—34° C. . . . . . efter 3—4 Døgn - . . . . . . Fig. 1.

Ved 26—28° C. fandtes efter 4—5 Døgn svagt udviklede Hindepletter med en Vegetation som . . . Fig. 1 og 2.
- 20—22° C. . . . . . efter 4—6 Døgn - . . . Fig. 1 og 2.
- 13—15° C. . . . . . - 8—10 Døgn - . . . Fig. 2.
- 6—7° C. . . . . . - 1—2 Mndr. - . . . Fig. 2.
- 3—5° C. . . . . . - 5—6 Mndr. - . . . Fig. 2.
- 2—3° C. optraadte ingen Hindedannelse.

I den foranstaaende Fremstilling af mine Undersøgelser over de sex Arters Hindedannelse ved forskjellige Temperaturer spille Afbildningerne en meget væsentlig Rolle. De ere udførte dels af mig selv, dels af Hr. Assistent Holm og alle tegnede efter Naturen. Jeg har lagt Vægt paa, at de skulle give saavel en fyldig som en nøjagtig Forestilling om de Former, hvormed vedkommende Art under de angivne Forhold optræder; at udtømme Stoffet kan der naturligvis slet ikke være Tale om; thi det er en Uendelighed af smaa Formforandringer, hver Arts Celler endog i den samme Kultur kunne fremvise; Opgaven maa derfor blive at gribe de fremtrædende Træk og at gjengive disse. I det Følgende ville vi først søge at erholde et Overblik over hver Arts Hindeformer for sig og derefter foretage en Sammenligning imellem de sex Arter paa een Gang for at se, hvilke Lærdomme vi derved kunne uddrage.

Vi begynde som sædvanlig med Sacch. cerevisiæ I. Fig. 2, Tavle III, forestiller, som det erindres, Vegetationen ved de højere Varmegrader (20—34° C.). Sammenlignes den med Udsæden (Fig. 1, Tavle I), ses det, at Kolonier ere blevne hyppigere, og at pølsedannede og lidt barokke Celler ikke ere sjældne. Større Lighed med Udsædens Celler have Vegetationerne ved Temperaturer fra 15—6° C. (Fig. 1, Tavle III).

Sacch. Pastorianus I stemmer i Kulturer ved 20—28° C. (Fig. 1, Tavle IV) nogenlunde overens med Udsæden (Fig. 2, Tavle I); Cellerne ere dog gjennemgaaende noget mindre og spinklere end dennes; (nogle af de langstrakte Celler i Fig. 1 ere mindre heldigt gjengivne). Ved Temperaturer under 15° C. bleve de i Reglen større og kraftigere, og ved 13—15° C. optraadte almindelig stærkt udviklede, mycelieagtige Kolonier af langstrakt pølsedannede Celler (Fig. 2, Tavle IV). Som sædvanlig iagttoges i de forskjellige Kulturer af denne ligesom af de øvrige Arter nogen Svingning i Forholdet mellem de ovale og de kort pølsedannede Celler paa den ene og de omtalte Kolonier paa den anden Side.

Ogsaa hos Sacch. Pastorianus II stemme Vegetationerne ved 20—28° C. (Fig. 1, Tavle V) temmelig nøje overens med Ud-

sæden (Fig. 3, Tavle I); ejendommelige ere kun de barokke, pølsedannede Celler, som her ofte udvikle sig. Vegetationerne ved Temperaturer fra 15—3° C. (Fig. 2, Tavle V) indeholde derimod overvejende ovale og runde Celler og have saaledes mistet deres typiske pastoriane Udseende.

Sacch. Pastorianus III, saa vi, udviklede ved 20—28° C. Vegetationer, der, ligesom Tilfældet var med de foregaaende, nogenlunde stemme overens med Udsæden. (Sammenlign Fig. 1, Tavle VI, med Fig. 1, Tavle II.). Vegetationerne ved 15—3° C. (Fig. 2, Tavle VI) ere derimod tydelig forskjellige derfra ved deres stærkt udviklede Kolonier af langstrakt pølsedannede og traadformede Celler, hvorved de meget nærme sig til de gamle Hinders Celler i Fig. 3. Det er denne Art, hvis Kolonier have størst Lighed med et virkeligt Mycelium. Ved paa anden Maade at experimentere med den, fremkom ogsaa flere Tegn, som kunde tyde paa, at den muligvis vil kunne bringes til at udvikle en Skimmelvegetation.

Sacch. ellipsoideus I har ved 20—34° og 6—7° C. mindre og forholdsvis flere pølsedannede Celler (Fig. 1, Tavle VII) end Udsæden (Fig. 2, Tavle II). Ved 13—15° C. udmærkede dens Vegetationer sig ved sine rigt forgrenede, stærkt udviklede Kolonier af kort eller langstrakt pølsedannede Celler, ofte med krandsstillede Grene, aldeles forskjellige fra Udsæden og lig de gamle Kulturer i Fig. 3. Det er en af de interessanteste Metamorfoser, Experimenterne have fremkaldt.

I Sacch. ellipsoideus II have vi en Art, som er karakteristisk derved, at Cellerne i Hindedannelserne paa de første Stadier væsentlig stemme overens ved alle Temperaturer fra 3 til 38° C. (Fig. 1 og 2, Tavle VIII) og ligeledes i det Hele ligne Udsædens (Fig. 3, Tavle II); de ere kun gjennemgaaende lidt mindre end dennes. Ved 15° C. og ved de lave Varmegrader vare Cellerne maaske oftest lidt mere langstrakte end ved de højere Varmegrader.

De netop beskrevne Hindedannelser af Arterne Sacch. cerevisiæ I, Sacch. Pastorianus II og Sacch. ellipsoideus II mangle de stærkt udviklede, mycelieagtige Kolonier af langstrakte Celler, som ere afbildede i Figurerne 3 paa de tilsvarende Tavler, hvilke, som det erindres, forestille de flere Maaneder gamle Hindedannelser i Kulturer i Pasteurske Kolber ved almindelig Stuevarme. Først efterat Dyrkningen er fortsat i flere Døgn eller Uger udover den i Tabellerne angivne Tid, træder en saadan Udvikling frem; det er følgelig ikke vanskeligt at holde de to Stadier ude fra hinanden. Vegetationer af væsentlig samme Udseende som de

gamle Kulturers fandtes derimod strax i de begyndende Hindedannelser hos Sacch. Pastorianus I og i endnu højere Grad hos Sacch. Pastorianus III og Sacch. ellipsoideus I. Om alle Arterne gjælder det, at en i lang Tid fortsat Dyrkning i Almindelighed fremkalder Vegetationer med mere langstrakte Celler, hvorved de for hver Art under Figurerne 3 tegnede Former efterhaanden komme frem.

Idet Vegetationerne nærme sig Grændsetemperaturerne, faa de et kraftesløst Præg; dette gjælder navnlig om Udviklingen ved de højere Varmegrader, hvor Cellerne ogsaa hurtigt erholde et ligesom dødt Udseende. Forsøg med hver af Arterne have overhovedet lært os, hvorledes vi idetmindste til en vis Grad kunne beherske Udviklingen og bestemme Cellernes Formforandringer.

Ved at betragte de sex Tavler med Hindevegetationerne, modtage vi strax Indtryk af at staa overfor et ligesaa stort Antal forskjellige Gjærsvampe; vi skulle nu foretage en nøjagtig Sammenligning og derefter nærmere paavise de vigtigste Differenser.

Figurerne 1 paa Tavlerne IV, V, VI og VII vise stor indbyrdes Lighed; de forestille, som ovenfor meddelt, de tre Arter af Gruppen Pastorianus og Sacch. ellipsoideus I. Fra disse adskille sig temmelig tydeligt den tilsvarende Fig. 1, Tavle VIII, af Sacch. ellipsoideus II og den ligeledes tilsvarende Fig. 2, Tavle III, af Sacch. cerevisiæ I. Hindevegetationerne ved de højere Temperaturer yde os altsaa kun en temmelig ringe Hjælp til at skjelne mellem vore sex Arter. Anderledes bliver det derimod, naar vi betragte de begyndende Hindedannelser, som udvikle sig ved 13—15° C., og som ere aftegnede i Figurerne 2, Tavle IV, V, VI, VII og VIII, og i Fig. 1 paa Tavle III; de vise os iøjnefaldende Differenser mellem flere af Arterne. Særlig vigtigt for os er, at de to Arter, Sacch. Pastorianus II og Sacch. Pastorianus III, som begge ere Overgjærformer, og hvis Udsæds Celler (Fig. 3, Tavle I, og Fig. 1, Tavle II) ikke med Sikkerhed kunne skjelnes fra hverandre, her optræde med aldeles forskjellige Vegetationer; det Samme gjælder ligeledes om de to i Udsæden ensartede Arter Sacch. ellipsoideus I og Sacch. ellipsoideus II. (Sammenlign Fig. 2, Tavle VII, med den tilsvarende Fig. 2, Tavle VIII).

Naar vi forene den mikroskopiske Undersøgelse af Udsædens Celler med en lignende Undersøgelse af Hindernes, ville vi altsaa under de angivne Livsbetingelser efter Cellernes Form kunne bestemme vore sex Arter. Egentlige Vanskeligheder træde kun frem,

naar Spørgsmaalet er at skjelne mellem Sacch. Pastorianus I og Sacch. Pastorianus II; her maa da i tvivlsomme Tilfælde andre Karakterer hjælpe os. Fra mine tidligere Undersøgelser erindres det, at Temperaturmaximum for Askosporernes Udvikling er lidt højere hos Sacch. Pastorianus I end hos Sacch. Pastorianus II, og at hin er en Undergjærform, denne derimod en Overgjærform.

Tidsbestemmelserne i foranstaaende Tabeller have kun til Hensigt at give en omtrentlig Forestilling om, hvor lang Tid der ved de forskjellige Varmegrader medgaar, førend de første makroskopisk kjendelige Hindedannelser vise sig. At finde et aldeles nøjagtigt Udtryk herfor er i Følge Sagens Natur næppe muligt. Allerede i de i Gjæringens Begyndelse dannede Skumblærer optræde de Gjærceller, ved hvis Formering senere, efterhaanden som Skummet forsvinder, Overfladen hurtigere eller langsommere dækkes med Hinde; skarpe Grændser i denne Udviklingsgang findes ikke, og de forskjellige Forsøgsrækker med de samme Species stille sig ogsaa noget forskjelligt. Større Interesse for os have Minimums- og Maximumstemperaturerne; disse ere, som Tabellerne vise, forskjellige for de forskjellige Arter.

Hos Sacch. cerevisiæ I og Sacch. ellipsoideus I standser saaledes Hindeudviklingen ved en Temperatur af henved 38 og mellem 5 og 6° C. Disse Grændser findes hos de tre Arter af Gruppen Pastorianus i Nærheden af 34 og af 3° C. Sacch. ellipsoideus II har samme Minimumstemperatur som den foregaaende Gruppe, men har den højeste Maximumstemperatur af alle de sex Arter, nemlig mellem 38 og 40° C. Efter Minimums- og Maximumstemperaturerne lade de sex Arter sig altsaa inddele i tre Grupper.

Ved at sammenligne de i mine Undersøgelser over Askosporedannelsen fundne Temperaturgrændser med de netop omtalte ses, at de hos samme Art ere indbyrdes forskjellige. En Overensstemmelse mellem Udviklingen af Askospore- og af Hindedannelsen viser sig dog deri, at de begge ere afhængige af Temperaturerne saaledes, at de indenfor de Grændser, hvor de kunne finde Sted, foregaa langsommere ved de lave og hurtigere ved de højere Varmegrader. Ved de Varmegrader, der ligge nær Minimums- og Maximumstemperaturerne, var Hindeudviklingen, som berørt, tillige altid meget svag, og der optraadte her aldrig en fuldstændig dækkende Hinde.

Ved Temperaturer over 13° C. havde Sacch. ellipsoideus II den hurtigste og kraftigste Udvikling; dette var saa iøjnefaldende, at man alene herved altid med Sikker-

hed kunde kjende de Flasker, hvori denne Art var, fra de andre. Men ved de derefter følgende lavere Varmegrader stod den noget tilbage for Sacch. Pastorianus III. En fuldstændig dækkende Hinde, der som et tykt Lag lejrede sig over hele Vædskens Overflade, udviklede sig f. Ex. hos Sacch. ellipsoideus II ved 22—23° C. i Løbet af 6—12 Døgn, medens den, for saa vidt der overhovedet indtraadte en saadan kraftig Udvikling hos de andre fem Arter, først var tilstede efter mere end den tredobbelte Tid. Ogsaa ved almindelig Stuevarme med dens til Døgnets forskjellige Tider vexlende Temperatur udmærkede denne Art sig ved sin hurtige og kraftige Udvikling af Hinde. De lavere Varmegrader, hvorom der her er Tale, navnlig om Natten, bevirkede dog, at Udviklingen foregik langsommere end ved den forannævnte Temperatur, og at Sacch. Pastorianus III kunde rivalisere med den. Forsøgene ved Værelsets Temperatur bleve anstillede i de Pasteurske Kolber (1/8 og 1/2 Liter), men med den samme Næringsvædske som i de tidligere omtalte Kogeflasker. Reglen var da, at de to nævnte Arter efter henved tre Maaneders Henstand havde udviklet en tyk Hinde, som dækkede hele Overfladen af Vædsken, hvorimod de andre fire Arter langtfra vare komne saa vidt; Sacch. ellipsoideus I stod som Regel længst tilbage.

Saaledes som de p. 179 beskrevne Forsøg bleve udførte, vare Flaskerne, der bleve stillede ind i Thermostaten ved de høje Temperaturer, udsatte for en mere eller mindre stærk Fordampning; herved blev altsaa en ny Faktor indført, der kunde antages at have en kjendelig Indflydelse paa Resultaterne. I den Anledning udførte jeg en Række kontrollerende Forsøg ved Varmegrader mellem 22 og 40° C. i en med Vanddampe mættet Atmosfære, men forøvrigt aldeles som foran beskrevet. Det viste sig da, at Udviklingen vel som Regel foregik lidt hurtigere og kraftigere, men at Hindernes Vegetationer vare af samme Art som ovenfor omtalt, og at de der angivne Temperatur-Grændser ej heller nu bleve overskredne.

I den forangaaende Undersøgelse er der, som flere Gange fremhævet, kun taget Hensyn til de egentlige Hindedannelser paa selve Vædskens Overflade, og Vegetationerne, som udvikle sig ovenover denne paa Glassets Væg, Gjærringdannelserne, ere ikke blevne behandlede. De udvikles hos Undergjærformerne paa samme Maade som Hinden, hos Overgjærformerne tillige derved, at der strax i Gjæringens Begyndelse aflejres en kjendelig Gjærmasse, hvorved et helt Bælte paa een Gang kommer frem.

Det blev p. 184 blandt andet fremhævet, at Hindedannelsen hos Sacch. cerevisiæ I og hos Sacch. ellipsoideus I standser i Nærheden af 38°, og hos Sacch. ellipsoideus II i Nærheden af 40°, medens dette hos de tre Arter af Gruppen Pastorianus allerede sker ved en Varmegrad under 34° C. Dette staar i Forhold til, hvad jeg i en tidligere Afhandling har berørt, nemlig at Arternes Maximumstemperaturer for Knopskydningen ikke ere de samme. Knopskydningen og Gjæringen finde imidlertid Sted udover en Temperatur, ved hvilken ingen Udvikling af Hinde kan indtræde. Hos de tre første Arter iagttog jeg saaledes livlig Gjæring og Knopskydning ved 38—40°, og hos de tre sidstnævnte ved 34° C. Men medens de tre Arter af Gruppen Pastorianus under de ovenfor beskrevne Dyrkningsforhold vare døde efter et Ophold af 11 Døgn (og muligvis endnu hurtigere) ved 36—38°, vare de andre tre Arter endnu levende efter et lignende Ophold ved 38° C. Sacch. ellipsoideus I og Sacch. ellipsoideus II udholde under de nævnte Omstændigheder et endnu længere Ophold; Sacch. cerevisiæ I staar i denne Henseende noget tilbage for disse to Arter. Idet vi tilmed erindre, at de to Arter af Gruppen Pastorianus ogsaa ere Overgjærformer, komme vi følgelig til den Erkjendelse, at det ikke er rigtigt, naar man har ment at kunne opstille den Regel, at Overgjærformerne skulde kunne udvikle sig ved højere Temperaturer end Undergjærformerne. Omvendt gives der Overgjærformer, som ved lave Temperaturer udvikle sig kraftigere end visse Undergjærformer (f. Ex. Sacch. Pastorianus II og Sacch. Pastorianus III modsat Sacch. ellipsoideus I). Efter foran staaende Synspunkter kunne vi altsaa dele vore sex Arter i to Grupper, og vi lære, at de Arter, som have de højeste Temperaturmaxima for Knopskydningen og Gjæringen, ogsaa have dem for Hindedannelsen.

Ved at undersøge Bundgjæren i de beskrevne Dyrkningsforsøg med de smaa Kogeflasker iagttog jeg, at den i de fleste Tilfælde havde det for Gjærmasser almindelige dejgagtige Udseende, men at den derimod i andre Tilfælde havde dannet et hindeagtigt, foldet Lag paa Bunden af Flasken. Som saadant optraadte den hos Sacch. Pastorianus II og Sacch. Pastorianus III. Hos førstnævnte var den dog dejgagtig ved de fleste Temperaturer og blev vistnok som Regel først hindeagtig ved Varmegrader under 7° C.; hos sidstnævnte udvikledes dejgagtig Bundgjær i Kulturerne ved Varmegrader fra 35—22° C., derefter viste der sig Tilløb til at danne

Bundgjær med hindeagtigt, foldet Udseende, og ved Varmegraderne fra 14—1° C. indtraadte dette paa en udpræget Maade[1]).

Den hindeagtige Bundgjærmasse hos de to nævnte Overgjærformer bestod hovedsagelig af kraftigt udviklede, mycelieagtige Kolonier og frembød følgelig et mikroskopisk Billede, der var tydelig forskjelligt fra Udsædens. Naar Kulturerne stode tilstrækkelig længe, viste det sig overhovedet, at Arternes Bundgjærformer i flere Tilfælde bleve forskjellige fra Udsædens, og at der herigjennem ogsaa kan erholdes morfologiske og fysiologiske Kjendetegn Ved at foretage Dyrkningsforsøgene paa fast Næringsbund ved høje Temperaturer, havde jeg Lejlighed til at gjøre lignende Iagttagelser. I disse Studier have vi saaledes atter erholdt Bevis for, hvilken Indflydelse Temperaturerne udøve. Samme Art kan under den forskjellige ydre Indvirkning optræde paa helt

---

[1]) Dette ejendommelige Bundfald har stor Lighed med det, som dannes af gamle, udpinte Vegetationer af forskjellige Saccharomyceter, naar de under gunstige Ernæringsforhold bringes til ny Udvikling. Hos mine tre Arter af Gruppen Sacch. Pastorianus iagttog jeg det ofte, naar jeg fra flere Maaneder gamle Kulturer i Saccharose eller i Urt inficerede ny Urt og derpaa foretog Dyrkningen ved 25—28° C., derimod, saa vidt jeg erindrer, aldrig hos de tre øvrige Arter. I flere Tilfælde bestode de saaledes dannede Bundfald ikke blot af hindeagtige Lapper, men tillige af osteagtige, smaa Brokker. Et Bundfald, som udelukkende var dannet af sidstnævnte, var ligeledes under de angivne Forhold hyppigt I begge Tilfælde var det løstliggende, og ved Rystning blev Vædsken ikke uigjennemsigtig og plumret; den holdt sig bestandig skinnende blank, ogsaa under den kraftigste Gjæring; man kunde saaledes tydelig iagttage, hvorledes Gjærflokke stege op fra Bunden til Overfladen og atter sank ned. Ved fra disse Kulturer at inficere nye lignende Kolber erholdt jeg i nogle Tilfælde Gjæringer med det samme ejendommelige Udseende og det samme mærkværdige Bundfald; men fortsattes Dyrkningen gjennem et tilstrækkeligt Antal Kulturer, viste det sig altid, at den iagttagne fysiologiske Omdannelse kun var foreløbig; de sædvanlige Forhold indtraadte atter, den udviklede Gjær lejrede sig paa Kolbens Bund som en dejgagtig Masse, og Urten blev under Kulsyreudviklingen uklar og plumret. Vi lære heraf blandt andet, at man ved en bestemt Behandling af flere forskjellige Gjærarter kan erholde osteagtig Gjær (levûre caséeuse).

Naar den udsaaede Gjær var tilstrækkelig gammel og afkræftet, fremkaldte den tillige en Affarvning af Vædsken, saa at det deraf dannede Øl fik en lysere Farve end ellers. Dette iagttog jeg ret hyppig saavel hos de ofte nævnte sex Arter som ogsaa hos de to rendyrkede Undergjærracer Nr. 1 og Nr. 2, som jeg har indført i Industrien.

forskjellig Maade, med helt forskjelligt Præg; men omvendt viser det sig ogsaa, at der er Grændser for denne Indvirkning, og at vore sex Arter reagere forskjelligt, et Tegn paa, at der gjør sig indre, de specielle Celler selv iboende Faktorer gjældende.

Et af de praktiske Resultater af mine Studier over Alkoholgjærsvampene bestaar deri, at der herigjennem har udviklet sig en Methode til Analyser af Bryggerigjær. Det er overhovedet for en stor Del under Paavirkning fra Praxis selv, at mine Arbejder ere sprungne frem. Da jeg for omtrent en halv Snes Aar siden begyndte at arbejde for Carlberg's store Bryggerier og navnlig havde den Opgave at undersøge Gjæren og følge dens Udvikling under Gjæringens Gang, følte jeg ofte, hvor Lidet der kunde udrettes paa dette Omraade. Analysen, som den da var mulig, gik ikke ud over at afgjøre, om der var Bakterier og Skimmelsvampe tilstede eller ej. At der i selve Gjærmassen, i de tilsyneladende ensartede Saccharomyces-Celler laa store og vigtige Hemmeligheder skjulte, og at det netop var der, at Angrebet skulde finde Sted, mærkede jeg vel temmelig snart, men den foreliggende Literatur gav ingen Opklaring. Under Trykket af det Trøstesløse i mit Arbejde og under Impulsen fra de ubesvarede Spørgsmaal, som den praktiske Drift daglig stillede til mig, saa jeg, at jeg enten maatte bryde en ny Vej eller opgive det Hele. Jeg besluttede da at prøve, hvad jeg formaaede. Skjøndt jeg ikke i Literaturen fandt det, jeg søgte, er det dog en Selvfølge, at den ydede mig en væsentlig Hjælp, navnlig vilde jeg næppe uden de betydningsfulde Forarbejder af Reess og Pasteur have været i Stand til at føre mit Værk igjennem.

Som et af Udgangspunkterne for mine Forsøg tog jeg en Undergjærmasse, der, efter hvad der forelaa, maatte bestemmes som eet Species, Sacch. cerevisiæ, og erklæres for ren, uden fremmed Indblanding. Jeg gik da ud fra den Forudsætning, at disse tilsyneladende ensartede Celler dog maaske kunde tilhøre flere Arter, og at jeg i saa Fald vel ogsaa vilde kunne opdage Skjelnemærker imellem dem. For at faa de stillede Spørgsmaal besvarede, udførte jeg først en stor Række Dyrkningsforsøg, hver med Udsæd af een eneste Celle efter de i min foregaaende Afhandling meddelte Methoder (p. 153 o. flg.), og med disse Renkulturer blev der dernæst paa forskjellig Maade experimenteret.

Det første Holdepunkt, jeg opdagede, var Udviklingsgangen af Sporerne hos Saccharomyceterne. I Afhandlingen af D'hr. Assi-

stenter Holm og Poulsen[1]) er det vist, at de derved vundne Resultater, naar de paa en fornuftig Maade anvendes i den praktiske Analyse, ikke blot give denne Sikkerhed, men tillige en stor Finhed.

Deraf udviklede sig som af sig selv mine Studier over Sygdomme i Øl, fremkaldte af Alkoholgjærsvampe, og Methoder til en planmæssig Udvælgen af bestemte Racer i Rendyrkninger for den store Industri.

Alle disse i deres Væsen strængt videnskabelige, men dog for Praxis direkte udførte Arbejder staa eller falde med den Forudsætning, at Saccharomyceterne optræde som Species, Varietet eller Race, at der, kort sagt, er Konstans i de af mig udfundne Karakterer. Speciesbegrebet, saaledes som det findes fremstillet i Reess's System, er, som vi oftere have havt Lejlighed til at erfare, forfejlet, og Pasteur indtager intet bestemt Standpunkt i den Retning. Virkelig Oplysning om dette saa vigtige Spørgsmaal kan naturligvis kun erholdes gjennem i Aar og Dag planmæssigt udførte Dyrkningsforsøg med absolute Renkulturer; saadanne ere, hvad Saccharomyceterne angaa, for første Gang satte i Værk af mig.

Det saaledes rejste Grundspørgsmaal er ikke løst endnu, men sikkert er det, at de hidtil anstillede Forsøg have lært, at Saccharomyceterne omfatte Former med høj Grad af Konstans, og at Alt viser hen til, at der i denne Slægt findes Arter af samme Værdi som hos de højere Svampe. Ogsaa mine foran meddelte Studier over Hinderne have bekræftet dette og givet nye Bidrag i den Retning. Det vil blive Opgaven for et senere Arbejde at bestemme paa en skarpere Maade, end det er sket, hvorledes disse indgaa som Led i den analytiske Methode.

Efterat de af mig rendyrkede Racer saavel i Ind- som i Udlandet vare blevne indførte i den store Praxis, kunde man der under ofte meget forskjellige Dyrkningsforhold gjøre vigtige Iagttagelser, om end ikke aldeles med den videnskabelige Strænghed som i Laboratoriet. Herved gaves værdifulde Bidrag til den levende Diskussion, som mine Afhandlinger fremkaldte. I de fleste Tilfælde blev der saavel af Theoretikere som af Praktikere fældet en gunstig Dom over det Nye, jeg havde ført frem, men Angreb undgik det ikke. I Spidsen for mine Modstandere stillede Direktøren for Forsøgsstationen i Berlin, Professor Dr. Delbrück, sig.

---

[1]) Holm og Poulsen: Hvor ringe en Infektion af »vild Gjær« kan efter Hansens Methode paavises i en Undergjærmasse af Sacch. cerevisiæ? (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, II B. 4 Hefte, 1886, p. 147).

Tildels støttende sig til Nägeli's Lærdomme, angreb han overhovedet mine Forsøg paa at indføre Rendyrkninger af bestemte udvalgte Racer i Industrien og advarede mod min botaniske Methode. I Tilslutning hertil tog den ansete Gjæringskemiker, Dr. Hayduck, fat paa Spørgsmaalet, om Ølgjærsvampen som Undergjær optræder med forskjellige Racer med konstante Egenskaber eller ej. Efter den endnu i Almindelighed gjældende Opfattelse betegner han al Ølundergjær som eet Species, og han mener, at de Differenser, hvormed den kan optræde, ere af rent forbigaaende Natur uden Konstans, saa at de under forandrede Dyrkningsforhold let og hurtigt udviskes. Det er i Virkeligheden den samme Lære, der findes hos de berømteste Forskere paa dette Omraade, og som herfra er vandret ud i populære Skrifter og Lærebøger. I den nyeste Tid har den faaet en Art Støtte i Nägeli's bakteriologiske Theorier. Indtil 1881 havde jeg, ledet af den almindelige Strøm, den samme Opfattelse, hvilket ses paa flere Steder i mine indtil da offentliggjorte Afhandlinger, og det var først, efterat jeg havde anstillet en stor Række selvstændige Forsøg, at jeg fik et andet Syn paa Sagen. Det Resultat, hvortil jeg paa dette Punkt er kommen, kan udtrykkes saaledes: Den Forestilling, der hidtil i Literaturen har været knyttet til det systematiske Navn Sacch. cerevisiæ (Undergjærform) er urigtig; thi der indbefattes derunder ikke een, men flere morfologisk og fysiologisk forskjellige Former, hvilke man med den samme Ret, som det er sket med de saakaldte »vilde Gjærarter«, Sacch. Pastorianus, Sacch. ellipsoideus o. s. v., kunde betegne med særegne Artsnavne. Disse Former kunne skjelnes fra hverandre ved bestemte Kjendetegn, og de have idetmindste en høj Grad af Konstans[1]).

Idet vi indtil videre anvende de gamle systematiske Navne, maa vi vel erindre, at vi ikke have Ret til at knytte de Forestillinger dertil, som tidligere fulgte dem. Det er denne Fejl, Dr. Hayduck har begaaet. Han har i sine Forsøg havt en Undergjær,

---

[1]) I en tidligere Afhandling har jeg angaaende det foreliggende Spørgsmaal fremhævet, at der endnu ikke kan være Tale om at afgjøre, hvad der hos Saccharomyceterne skal kaldes Species, Varietet, Race eller Afændring. Jeg har derfor ejheller i nærværende Afhandling villet indføre nye systematiske Navne. For overhovedet at kunne tale om disse Gjenstande, vil man imidlertid vanskelig kunne undgaa at benytte Betegnelser som Art eller Race; disse Ord betyde da kun, at der er Tale om Organismer, som i en eller anden Retning adskille sig fra hverandre ved konstante Karakterer.

som efter den tidligere Undersøgelsesmethode kunde bestemmes som ren Sacch. cerevisiæ, og hildet i den gamle Opfattelse, at der her maatte være eet Species tilstede, har han arbejdet med den som saadan uden som jeg at opløse den i sine eventuelle forskjellige Bestanddele.

Angrebene fra mine ærede Kollegaer i Berlin have bevirket, at Sagen er bleven belyst fra flere Sider, og de have fremkaldt flere ypperlige Forsvarsskrifter derfor[1]). Ogsaa blev den i det Hele gunstig bedømt paa den i Berlin i April 1885 afholdte Generalforsamling. Striden er ikke afsluttet, men foreløbig indtraadt i et roligere Stadium, og den almindelige Anskuelse derom kan vistnok siges at have erholdt sit Udtryk i nedenstaaende korte Résumé, som Bayerns berømte zymotekniske Skribent Professor, Dr. Lintner sen. nylig gav deraf[2]):

»Efterat forskjellige Bryggerier have anvendt Carlsberg's rendyrkede Gjærracer, og den videnskabelige Station i München ogsaa har indført rendyrkede Münchener Racer i Bryggerierne, lade de erholdte Kjendsgjerninger sig sammenfatte i følgende Punkter:«

1) »Ved Indblanding af saakaldet »vild Gjær« kan en ellers normal Bryggerigjær blive ude af Stand til at frembringe et velsmagende og holdbart Øl«.

2) »En saadan Indblanding kan indtræde ved de om Sommeren og Efteraaret i Luftens Støv indeholdte vilde Gjærarter eller ogsaa ved Smitte fra Bærme eller anden Gjær«.

3) »Ved at anvende Hansen's Methoder til Rendyrkning og

---

1) Jeg selv har hidtil ikke udtalt mig i denne Strid; de vigtigste af de fremkomne Indlæg deri skyldes:
Delbrück (Wochenschrift für Brauerei. Berlin 1885, p, 126).
Hayduck (Sammesteds, p. 314).
J. C. Jacobsen (Sammesteds, p. 126, og Zeitschrift für das ges. Brauwesen. München 1885, p. 117).
Aubry (Zeitschrift für das ges. Brauwesen. München 1885, p. 133 og p. 237).
Belohoubek (Der Böhmische Bierbrauer, Prag 1885. p. 498).
Alfred Jørgensen (Allgemeine Zeitschr. für Bierbrauerei und Malzfabr. Wien 1885, p. 489 o. flg., p. 609 o. flg. Allgemeine Brauer- und Hopfenzeitung. Nürnberg 1885, p. 359, og Festnummeret sammesteds).
Thausing (Allgemeine Zeitschr. für Bierbrauerei und Malzfabr. Wien 1885, p. 755).
Will (Allgemeine Brauer- und Hopfenzeitung. Nürnberg 1885, Festnummeret).

2) C. Lintner, Zymotechnische Rückblicke auf das Jahr 1884. (Zeitschr. für das ges. Brauwesen, München 1885, p. 399).

Analyse kan man atter af en saadan uren Gjærmasse erholde den ønskede Bryggerigjær i ren og god Tilstand«.

4) »Den rendyrkede Gjær viser i en fremragende Grad igjen de Egenskaber, som den oprindelige Gjær havde, før Rendyrkning blev nødvendig; dette gjælder saavel om Forgjæringsgraden som om Smagen og Holdbarheden af det paagjældende Øl«.

5) »Der existere forskjellige Racer af normal Ølundergjær (Sacch. cerevisiæ) med særegne Egenskaber, der som Raceejendommeligheder bevare sig konstante«.

At jeg selv har et skarpt Blik for, hvad der endnu fattes, forinden min Bygning kan siges at være grundmuret, derom give nærværende nye Undersøgelser et Vidnesbyrd. Ovenstaaende Redegjørelse skal tjene til at klare Forestillingerne om mine Arbejders Stilling, særlig med Hensyn til de fremhævede Grundspørgsmaal, og herved fjerne de Misforstaaelser, der ere fremkomne.

I Forbindelse med Udviklingen af Hinderne staa kemiske Omdannelser af den nedenunder værende Vædske; disse vise sig blandt andet deri, at der foregaar en Affarvning. Det efter Hovedgjæringens Slutning dannede Øl er mørkebrunt ligesom Urten, hvormed Forsøget blev anstillet, og der er ikke for Øjet nogen stor Forskjel i Farven. En saadan træder imidlertid frem, naar Ølvædsken staar hen en kortere eller længere Tid, og dens Overflade dækkes med Hinde. Denne Farveforandring kan da i høj Grad være paafaldende, idet den oprindelig mørkebrune Vædske endog kan blive lysegul. En saadan Affarvning har jeg ikke blot hyppig iagttaget hos de foran nævnte sex Arter, men overhovedet hos alle de talrige Saccharomyceter, hvormed jeg i Aarenes Løb experimenterede, og den finder ligeledes Sted hos Gjærceller, der ikke formaa at udvikle endogene Sporer, muligvis dog ikke hos alle Arter.

I Forsøgene ved Værelsets Temperatur er denne Affarvning især i høj Grad fremtrædende i Kulturer med Sacch. ellipsoideus II og Sacch. Pastorianus III, de to Arter, der under de tilstedeværende Forhold regelmæssig have de kraftigste Hindeudviklinger. Ligesom Hindedannelsen indtræder ogsaa Affarvningen hurtigere ved højere end ved lavere Varmegrader; saaledes var den f. Ex. i de beskrevne Dyrkningsforsøg med Sacch. ellipsoideus II ved Varmegrader mellem 26 og 35° C. meget iøjnefaldende allerede efter 7 Døgns Forløb.

Denne Affarvning minder meget om den, Saccharomyceterne under andre Livsforhold kunne fremkalde, og som jeg kortelig har berørt i Anmærkningen p. 187.

De foran beskrevne Forsøg ere udførte under visse bestemte Livsbetingelser for vedkommende Organismer; ændres disse, blive ogsaa vore Resultater anderledes; en ringe Forandring i den angivne Forsøgsanordning faar dog ikke nogen kjendelig Indflydelse. Det er berørt, hvilken Betydning den mere eller mindre rigelige Adgang af Luften har; i det Følgende skal fremføres nogle Exempler paa den Rolle, Næringsvædskens kemiske Sammensætning spiller. Til de p. 173 o. flg. omtalte Undersøgelser blev der, som det erindres, benyttet Pasteurske Kolber med steriliseret Urt som Næringsvædske, hvilke, efter at være blevne inficerede hver med sin Gjærart, derpaa bleve hensatte ved almindelig Stuevarme. Aldeles paa samme Maade foretoges til Sammenligning efterstaaende nye Forsøg med to af de ofte nævnte Arter, nemlig Sacch. cerevisiæ I og Sacch. ellipsoideus II, kun med den Forskjel, at der blev benyttet andre Næringsvædsker. Fra hver Art inficeredes 4 Kolber; to af disse, A, indeholdt et vandigt Afkog af Gjær, to, B, saadant Gjærvand og Saccharose, to, C, destilleret Vand og 10 % Saccharose, og to, D, destilleret Vand. Efter 3 Maaneders Forløb fandtes paa Overfladen af Vædsken i de to Kolber A ret talrige hvidladne, smaa Gjærpletter, vistnok nedadtil halvkugle- eller kegleformede og mere eller mindre flade paa den opadvendte Del; de optraadte enkeltvis eller samlede i Grupper. I B fandtes et meget ringere Antal deraf, og i C og D slet ingen. Denne Udvikling kom i Løbet af et Aar ikke videre. Begge Arterne stemmede overens i ovennævnte Forhold og ligeledes deri, at de omtalte Hindepletters Celler i alt Væsentligt lignede den tilsvarende Udsæds, altsaa Fig. 1, Tavle I (Sacch. cerevisiæ I), og Fig. 3, Tavle II (Sacch. ellipsoideus II). Hos den første fandtes desuden temmelig faa og hos den sidste temmelig talrige Celler med Askosporer i Kolberne A og kun i disse.

Hovedresultatet var, at der kun i Kolberne med Gjærvandet optraadte en tydelig Hindedannelse, men at denne ingensinde, ejheller efter lang Henstand, naaede udover de første Udviklingsstadier, og at den følgelig stod meget tilbage for den, der under lignende Forhold plejer at udvikle sig paa Urt. De øvrige Vædsker gave et endnu ugunstigere Resultat. Ved at sammenligne de nylig citerede Figurer med de tilsvarende Fig. 3, Tavle III, og Fig. 3, Tavle VIII, ses det tydeligt, at der ogsaa var Forskjel paa

de Hindevegetationer, som Gjærvandet, og paa dem, som Urten under lignende Omstændigheder fostrede.

Denne foreløbige Undersøgelse giver et nyttigt Vink om, ad hvilken Vej det vil være muligt at udfinde de for Hindedannelsen gunstigste Betingelser, hvad Næringsvædskens kemiske Sammensætning angaar.

Ogsaa Bundgjæren blev undersøgt. I Kolberne A, C og D stemmede den temmelig nøje overens med den tilsvarende Udsæd, Kolberne B (Gjærvand + Saccharose) bestod den derimod af Vegetationer, som havde større Lighed med de nylig anførte Fig. 3, Tavle III (Sacch. cerevisiæ I), og Fig. 3, Tavle VIII (Sacch. ellipsoideus II).

Bundgjæren i Kolberne med Gjærvandet og Vandet, A og D, indeholdt temmelig talrige Celler med Askosporer; disse manglede derimod fuldstændigt i Kolberne B og C, hvori der var Sukker tilstede, og hvor kraftig Gjæring indtraadte.

Med Mycoderma vini har Winogradsky fornylig anstillet experimentelle Undersøgelser over Ernæringsforholdenes Indflydelse paa Cellernes Form og Udvikling[1]). For at sikkre sig Ensartethed i Iagttagelsesmaterialet, sørgede han for, at de i hans Kultur-Apparater udsaaede Celler alle stammede fra een eneste Modercelle; dette opnaaede han ved at anvende den af mig angivne Fremgangsmaade. Der blev udført to Forsøgsrækker; i den ene vexlede Næringsvædskernes organiske Bestanddele, medens de mineralske forbleve konstante; i den anden vare Næringsvædskerne derimod forskjellige fra hverandre med Hensyn til deres mineralske Bestanddele, medens de organiske Stoffer vare de samme. Det viste sig, at Cellernes Form under disse vexlende Ernæringsforhold ikke holdt sig konstant; i enhver af de anvendte Forsøgsvædsker blev der nemlig paavist visse for dennes Vegetation ejendommelige Habitusforandringer.

En Undersøgelse, der tildels bevæger sig paa samme Omraade som den foran omtalte, men som næppe har den samme Værdi, er forrige Aar offentliggjort af Dowdeswell[2]). Denne Forsker antager det som en bevist Sag, at Sacch. cerevisiæ kun er en Udviklings-

---

[1]) Winogradsky, Ueber die Wirkung äusserer Einflüsse auf die Entwickelung von Mycoderma vini. (Botan. Centralblatt, XX B., 1884, p. 165).

[2]) Dowdeswell, On the occurrence of variations in the development of a Saccharomyces. (Journal of the Royal Microscopical Society. London. Ser. II. Vol. V. 1885, p. 16).

form af Penicillium glaucum, og beretter derefter om Forsøg, som han anstillede med en skimmelagtig Svamp fra Plantedele i fugtige Kamre med 10 % Rørsukkeropløsning som Næringsvædske. Ifølge hans Beretning udviklede der sig under disse Forhold talrige Celler, hørende til en ny Saccharomyces-Art, og de formerede sig ikke blot paa den sædvanlige Maade ved Knopskydning og endogen Sporedannelse, men frembragte tillige et Mycelium. Som det vigtigste Resultat fremhæves den Iagttagelse, at disse saa forskjellige Udviklingsformer ere komne frem under de samme ydre Forhold, hvorfor de maa antages at skyldes en Arten selv iboende Tilbøjelighed til Variation. Han ser heri en Bekræftelse paa Darwin's Lære, nemlig at iblandt de to Faktorer, som betinge en levende Organismes Variation (Organismens egen og de ydre Forholds Natur), er det den første af disse, som maa antages at være den vægtigste. Hvad selve Undersøgelsen angaar, da strider det mod alle mine Iagttagelser, at Sporerne skulde kunne udvikle sig under de angivne Omstændigheder; der er derfor her næppe Tale om en Saccharomycet. Havde han Ret, vilde hans Arbejde være af stor Betydning i flere Henseender. Saaledes som det er affattet, gjør det imidlertid bestemt Indtryk af at være et af de talrige vilde Skud, som Læren om Pleomorfismen hos Saccharomyceterne har fremkaldt.

I mine Undersøgelser over Hindedannelserne havde jeg i særlig Grad min Opmærksomhed henvendt paa, om Cellerne i disse udviklede Askosporer eller ej. Det viste sig da, at dette, naar Næringsvædsken var Ølurt, kun rent undtagelsesvis fandt Sted; thi uagtet jeg i den lange Tid, der medgik til de foran beskrevne Forsøg, undersøgte et meget stort Antal Præparater, iagttog jeg dog kun i eet eneste Tilfælde nogle faa Celler med disse Formeringslegemer; de optraadte tilmed ikke i Hinden men i den Gjærringdannelse, der havde strakt sig opad Kolbens indvendige Væg, ovenover Vædskens Overflade.

Anderledes stillede det sig derimod i de ovenfor omtalte Forsøg, hvor der i Stedet for Ølurt blev benyttet Gjærvand som Næringsvædske. Vi have nemlig der hørt, at der i de svage Tilløb til Hindedannelse, som fandt Sted i Kulturerne med de to Arter, Sacch. cerevisiæ I og Sacch. ellipsoideus II, i Kolberne A, udviklede sig temmelig talrige Celler med Askosporer. Det er værd at lægge Mærke til, at de derimod ikke optraadte i de Kolber, hvor der

til Gjærvandet var sat Saccharose. Vi kunne af de forangaaende Iagttagelser vistnok uddrage den Slutning, at Askosporer ikke optræde, hvor en Forgjæring af Sukker kan finde Sted, og som Regel ej heller, hvor Forholdene tilstede en kraftig Hindeudvikling. At disse Formeringslegemer udvikle sig i Kulturer med Gjærvand har forøvrigt intet Paafaldende ved sig, thi de kunne, som jeg tidligere har vist, ogsaa udvikle sig i denne Vædskes Bundgjær.

Efterhaanden som den mikrokemiske Teknik har udviklet sig til en større Fuldkommenhed, er ogsaa vor Viden om Cellekjærnens Bygning og dens Optræden i høj Grad bleven forøget. Navnlig gjennem Schmitz's Undersøgelser ere vi blevne oplyste om, at Cellekjærner optræde hos en Mængde lavtstaaende Planter, hvor man tidligere ikke havde kunnet iagttage dem. I 1879 opdagede denne Forsker ogsaa hos Sacch. cerevisiæ (Ølgjær) Legemer, som han opfatter saaledes[1]). Han meddeler, at der i hver Celle findes een kugleformet Cellekjærne, og at den er indlejret i Plasmaet omtrent i Cellens Midte. Ogsaa hos Mycoderma vini fandt han den under lignende Omstændigheder.

Ved at anvende den af Schmitz angivne Præparations-Methode (Pikrinsyre-Hæmatoxylintinktion) iagttog jeg lignende Legemer hos de efterfølgende Saccharomyceter: Carlsberg Undergjær Nr. 1, Burton Overgjær, Sacch. Pastorianus I og Sacch. Pastorianus II. Kun viste det sig, idetmindste i nogle Tilfælde, at de ikke, som Schmitz meddeler, vare kuglerunde men skiveformede; de optraadte ej heller som Regel i Cellens Midte, men ligesaa hyppig i dens ene Ende. Da jeg for nogle Aar siden havde Lejlighed til at tale med Professor Schmitz selv om disse Forhold, og vi sammenlignede vore Præparater, kom vi til den Slutning, at mine blaat farvede Legemer vare de samme som de af ham opdagede. I en af sine Afhandlinger gjør han selv opmærksom paa, at Cellekjærnen hos samme Celle kan optræde med forskjellig Form under de forskjellige Udviklingsstadier; i yngre Celler er den ofte kugleformet, medens den i ældre tidt bliver skivedannet med afrundet eller uregelmæssig Omkreds. Skjøndt der paa dette Sted ikke er

---

[1]) Schmitz, Resultate der Untersuchungen über die Zellkerne der Thallophyten. (Separat-Abdruck aus den Sitzungsberichten der niederrhein. Gesellsch. für Natur- und Heilkunde zu Bonn, 1879, p. 18).

Tale om Gjærceller, antager jeg dog, at Differensen mellem Schmitz's og mine foran berørte Iagttagelser heri finder sin Forklaring. Cellekjærnen bliver ved den nævnte Behandling blaatfarvet; Cellernes Membran farves derimod ikke, ej heller de under visse Omstændigheder tilstedeværende Fedtlegemer. Senere iagttog jeg, at man ved at behandle Gjærcellerne med Osmiumsyre og ved derefter at anbringe dem i fortyndet Glycerin paa en lettere Maade erholdt ligesaa gode Præparater som de foregaaende.

Det har hidtil ikke været muligt i disse Legemer at iagttage de for karakteristiske Cellekjærner ejendommelige Bygningsforhold, ikke heller har man med Bestemthed kunnet paavise, hvilken Rolle de spille ved Gjærcellernes Knopskydning og ved deres endogene Sporedannelse. Det er altsaa kun Farvningsforholdene, hvortil Schmitz støtter sig; han har imidlertid paa dette Omraade en saa stor Indsigt og Erfaring, at det næppe kan tænkes, at han skulde have taget fejl; tilmed er det saavel i Følge almindelige biologiske Betragtninger som navnlig ved flere i den nyere Tid udførte kemiske Undersøgelser gjort i høj Grad sandsynligt, at Cellekjærner maa findes hos Saccharomyceterne. Rigtigheden af Schmitz's Iagttagelse er ogsaa bleven bekræftet af Strasburger.

Senere har Zalewski i det polske Sprog offentliggjort en Afhandling[1]), hvori han meddeler, hvorledes man med Lethed kan paavise Cellekjærnen i Gjærcellerne og i disses Sporer, nemlig ved at man, efter i Forvejen at have behandlet Cellerne med Vand nogle Timer, derpaa farver dem med en Hæmatoxylin- og Alunopløsning. Han meddeler, at Sporerne udvikles ved fri Celledannelse, og beskriver, hvorledes Cellekjærnen under denne Proces deler sig. Om han har havt de samme Legemer for sig som Schmitz ses ikke; dennes Undersøgelser synes i hvert Fald at have været ham ubekjendte. Ogsaa hos Mycoderma vini mener Zalewski at have gjort ovenstaaende Iagttagelse. (Om denne Art se mine Bemærkninger p. 169).

Omtrent paa samme Tid udtaler Krasser derimod den Anskuelse, at der ingen Cellekjærne findes i Gjærcellerne[2]). Ved at anvende den af Schmitz angivne Methode, kom han bestandig til

---

[1]) Zalewski, Ueber Sporenbildung in Hefezellen. (Verhandl. und Berichte der Krakauer Akademie der Wissenschaften. Mathemat.-naturwissenschaftl. Section. I, B. XII, 1885. Mit einer Tafel. Ref. Botan. Centralbl., B. XXV, p. 1).

[2]) Krasser, Ueber das angebliche Vorkommen eines Zellkerns in den Hefezellen. (Oesterreichische Botan. Zeitschrift. 1885. Nr. 11, p. 373).

et negativt Resultat. At Schmitz's mikroskopiske Iagttagelse er rigtig, have vi ovenfor hørt; Krasser maa altsaa have været uheldig med sine Forsøg.

Under mine Experimenter havde jeg ligeledes flere Gange Lejlighed til at iagttage Cellekjærnen i Hindernes Celler hos de tre Arter, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus II og Sacch. ellipsoideus I, og uden at foretage nogensomhelst Farvning, kun ved at anbringe de paagjældende Celler i et almindeligt mikroskopisk Præparat i lidt Vand eller i Hantsche's Glycerinblanding. De fandtes i de foran omtalte gamle Kulturer i de Pasteurske Kolber, som bleve anstillede ved almindelig Stuevarme, og ligeledes i Kulturer, hvortil Kogeflasker anvendtes, ved Varmegrader fra 14—6° C. Om deres Optræden i Hinderne er indskrænket til de angivne Forhold og Species kan jeg ikke afgjøre, da jeg ikke har anstillet særlige Undersøgelser med dette Spørgsmaal for Øje.

I det Foregaaende ere Saccharomyceternes Hindeformer blevne studerede fra forskjellige Sider; der staar endnu tilbage at omtale den Slimudvikling, som findes mellem Cellerne.

Det er enhver praktisk Brygger bekjendt, at Gjærcellerne i det gjærende Øl under visse endnu ikke kjendte Betingelser kunne forene sig til uregelmæssige Klumper, der med forholdsvis Lethed synke til Bunds, saa at den ovenstaaende Vædske bliver »blank«. Der sættes megen Pris paa, at dette sker. Man har skjænket Fænomenet en stor Opmærksomhed, og det omtales hyppigt i Skrifter om Gjær, saavel i de rent videnskabelige som i de tekniske, men noget nøjere Kjendskab dertil har man som sagt endnu ikke opnaaet. Der er vel ved kemisk Behandling af almindelig Ølgjær blevet fremstillet et Kulhydrat, hørende til Planteslimene, og hvorom det formodes, at det stammer fra Cellens Membran, men at afgjøre dette væsentlige Spørgsmaal har hidtil vist sig at være umuligt. Med Mikroskopet blev der ligeledes længe forgjæves søgt efter gelatinøse Dannelser hos Gjærcellerne. Først i 1884 lykkedes det mig at opdage saadanne. (Botan. Centralblatt, B. XXI, Nr. 6). Jeg har senere fortsat disse Undersøgelser og skal her i Korthed meddele de vigtigste af mine Resultater. Under visse Betingelser kan der hos Saccharomyceterne og flere andre Arters Gjærceller, som mangle endogen Sporedannelse, optræde Dannelser, der vise sig som et gelatinøst Netværk, bestaaende af Strænge eller Plader. I dettes Masker og Rum finder man da Cellerne

indlejrede. De oprindelig mellem disse tilstedeværende Granulationer kunne blive optagne i Netværkets Substans, hvorved denne da ogsaa kan blive farvet deraf. Som det er Tilfældet med de fleste gelatinøse Membraner, bliver den ej heller farvet blaa af Jod. En let Maade, at erholde denne Dannelse paa, bestaar deri, at man anbringer en Klump tyk Gjær, som den almindelig findes i Bryggerierne, i et Glas, bedækker dette og lader det Hele staa en kort Tid. Den træder frem, medens Gjæren endnu er temmelig fugtig; derimod udebliver den, hvis Udtørringen foregaar hurtigt. Almindelig iagttages den i Askosporekulturer paa Gibsblokke og paa Gelatine. Ifølge mundtlig Meddelelse fra Hr. Alfred Jørgensen var den ligeledes hyppig tilstede i de talrige Filtrerpapirs-Præparater af Gjær, der i Løbet af det sidste Aar fra forskjellige Steder bleve indsendte til hans Laboratorium[1]). Det er ejheller i den store Praxis noget sjældent Fænomen.

Denne Netværkdannelse iagttog jeg temmelig hyppig hos Sacch. cerevisiæ I, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus II, Sacch. ellipsoideus I og Sacch. ellipsoideus II saavel i Hinderne som navnlig i Gjærringdannelsen og saavel ved de høje som ved de lave Temperaturer. At den ogsaa ved fortsat Eftersøgen under de samme Omstændigheder vil findes hos Sacch. Pastorianus III, antager jeg; ved Forsøg med denne Arts Bundgjær fandt jeg den i hvert Fald flere Gange.

I Experimenter med almindelig Paasætningsgjær fra Gjæringskjælderen viste det sig som sædvanlig, at man ikke ved mikroskopisk Undersøgelse af Cellerne i denne Tilstand kunde opdage noget Spor af det ofte omtalte Netværk eller overhovedet af gelatinøse Dannelser. Ved derpaa at foretage Farvninger efter flere af de i Bakteriologien almindelig anvendte Methoder traadte det meget smukt og tydeligt frem. Den mikrokemiske Præparation hærdner den mellem Cellerne værende Slimmasse, saa at den nu antager en bestemt Form. Medens Cellerne selv blive stærkt farvede, modtager Netværket enten slet ingen eller kun en svag Farvetone. Foretages en vidtgaaende Udvaskning, kan man erholde en Gjærmasse, der, naar den behandles efter de ovenfor berørte Farvningsmethoder, ikke længere viser os Netværket. Fjerner man imidlertid Vandet fra de saaledes mishandlede Celler og lader dem staa en Tidlang, kan Slimmassen gjenfrembringes, og ved

---

[1]) Om denne bekvemme Maade at præparere Gjær til Forsendelse og langvarig Opbevaring findes Oplysninger i min foran citerede Afhandling om Askosporedannelsen i Afsnittet Methoder, p. 63.

passende Præparation træder Netværket da atter frem. Dette gjælder ogsaa om de nye Generationer, man erholder ved at udsaa de gamle, udvaskede Celler i Urt.

Som man maatte vente, er denne gelatinøse Dannelse afhængig af Cellernes Ernæringsforhold saaledes, at man ved at variere disse kan fremme eller hæmme den og indvirke paa dens kemiske Sammensætning.

Ovenstaaende Spørgsmaal ville blive udførligere behandlede i en særskilt Afhandling, ledsaget af de fornødne Afbildninger, og heri vil der da ogsaa blive givet Oplysning om den gelatinøse Dannelses Forhold til, hvad man hos Bakterierne kalder Zooglöa.

Mine Forgængeres Bidrag til Kundskaben om Hindedannelsen hos Saccharomyceterne.

De første Antydninger om Vegetationer af denne Art findes i det for sin Tid fortjenstfulde Værk af Reess, »Botanische Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze«, 1870. Jeg tænker navnlig paa det Sted p. 14, hvor han omtaler Kulturer af Overgjær paa Gulerodskiver i fugtigt Rum. Under disse Dyrkningsforhold formere Cellerne sig og fremkalde en svag Alkoholgjæring, og navnlig paa Overfladen af det Gjærlag, der saaledes efterhaanden dannes, udvikler der sig i umiddelbar Berøring med Luften en Vegetation af langstrakte, undertiden barokke Celler. (Se Reess's Tavle I, Fig. 14).

Medens hos Reess den morfologiske Beskrivelse er Hovedsagen, træder hos Pasteur Experimentet bestandig i Forgrunden; det er overhovedet, som bekjendt, fra denne store Naturforsker, at hele det moderne experimentelle Studium af Mikroorganismerne har sit Udspring. Ogsaa til det i nærværende Afhandling behandlede Hovedspørgsmaal har Pasteur givet Bidrag.

I det af mig saa ofte citerede Værk, »Études sur la bière«, 1876, gives p. 201 en Meddelelse om »en ny Slags Alkoholgjærsvampe, levûres aérobies ou levûres-moisissures«. Pasteur bemærkede, at der paa Overfladen af Vædsker, hvori en Alkoholgjæring havde fundet Sted, og som derefter havde staaet en lang Tid, dannedes en mycodermaagtig Hinde eller langs Overfladens Rand et Gjærbælte. Det er denne Gjærvegetation, som han betegner med de ovenfor nævnte Navne, og han meddeler, at han især iagttog den i Øl og lignende Næringsvædsker. Den kraftigste og hurtigste Udvikling fandtes der, hvor der var rigeligst Adgang

af Luften. Om disse levûres aérobies fremhæver han p. 205, at de, skjøndt de ligne deres tilsvarende Udsæd, dog ikke ere identiske dermed. »I de fleste af mine Experimenter,« siger Pasteur, »har jeg set den nye levûre aérobie optræde som en Overgjærform og give et Øl, der havde noget mere parfumeagtigt ved sig end det Øl, som frembragtes af den Undergjær, hvorfra den paagjældende levûre aérobie oprindelig stammede. Disse Egenskaber hos levûre aérobie ere ikke indskrænkede til den første Kultur, de ere nedarvelige.« P. 213 opkaster Pasteur det Spørgsmaal, om ikke den i Industrien benyttede Overgjær er levûre aérobie - Formen af Undergjæren, og tilføjer: »Jeg er tilbøjelig til at tro, at den Gjær, som jeg har kaldet ny Overgjær, kunde være levûre aérobie af Undergjæren fra Bryggerierne i Elsas eller i Tydskland.« Paa et tidligere Punkt i sin Bog, p. 189, er han imidlertid ad experimentel Vej kommen til et andet Resultat, nemlig at Over- og Undergjær ere to differente Arter, der ikke lade sig overføre til hinanden; men den berørte Ide om, at det Modsatte dog alligevel turde være Tilfældet, har øjensynlig under Redaktionen af Værket mere og mere grebet ham. I en hel anden Forbindelse (p. 333, Anmærkningen) vender han saaledes atter tilbage dertil. Her gives nemlig de praktiske Bryggere en Recept paa, hvorledes de skulle behandle deres Undergjær, hvis de ville sikkre sig imod, at den ikke gjennem Udviklingen af levûre aérobie en skjøn Dag skal blive omdannet til Overgjær.

Af det Foregaaende maa vi nærmest slutte, at det er Pasteur's Mening, at den »nye Slags Gjær« er en Udviklingsform af den almindelige Bundgjær. I Anmærkningen p. 205 udtaler han imidlertid selv Tvivl i den Henseende og henviser til den Mulighed, at levûre aérobie-Formerne kunne tænkes at have været tilstede som skjulte Indblandinger i de Gjærmasser, hvormed Forsøgene bleve anstillede. Han opstiller Grunde for og imod denne Opfattelse uden dog at kunne komme til en Afgjørelse af dette saa vigtige Punkt.

Det meddeles, at levûre aérobie - Cellerne væsentlig have samme Form, som Cellerne af den Udsæd, hvormed Forsøgene begyndte, og som Cellerne i den tilsvarende Bundgjær; levûre aérobie af Overgjær skal saaledes under alle Omstændigheder have kuglerunde Celler o. s. v. Derimod angiver han, at der er Forskjel paa Udseendet af Hinde- og Gjærringdannelserne hos de forskjellige Arter: Hos Sacch. Pastorianus siges levûre aérobie at danne en Ring paa Vædskens Overflade i Nærheden af Kolbens Væg, en Ringdannelse, som ved den mindste Rystelse af Vædsken

skilles ad. Levûre aérobie af Overgjær angives at optræde som smaa isolerede Vorter paa Overfladen af den gjærede Vædske. Undergjærens levûre aérobie siges at danne et Lag, som ikke holder sammen, men som ved den mindste Rystelse synker til Bunds lig en Regn af smaa uregelmæssige Brokker uden dog at fordele sig. Den caséeuse Gjærs levûre aérobie skal være karakteristisk derved, at den danner en sammenhængende tyk, fedtet Hinde, der imidlertid ligesom den foregaaende Arts ved Rysten skilles ad i Brudstykker.

Hermed have vi stiftet Bekjendtskab med det Væsentligste af, hvad Pasteur meddeler om levûre aérobie. Sammenlignes dermed mine foregaaende Studier over Saccharomyceternes Hindedannelse, faar man strax det Indtryk, at det vistnok maa være de samme Fænomener, hvorom Talen er; ved nøjere Betragtning træder dog den store Uoverensstemmelse frem, og der opstaar Tvivl derom.

Det første Punkt, vi skulle undersøge, er Pasteur's Paastand om, at Undergjær gjennem Udviklingen af levûre aérobie strax omdannes til Overgjær, og at de herved erhvervede nye Egenskaber ikke ere foreløbige, men nedarvelige. Med dette Spørgsmaal for Øje anstillede jeg et stort Antal Forsøg saavel med mine sex ofte nævnte Arter som med en Undergjærrace, udskilt fra gjærtykt Øl[1]), med Carlsberg's Undergjær Nr. 1 og endelig med en Gjærart, for hvilken jeg strax vil fastslaa Navnet Sacch. exiguus, og om hvilken nærmere Oplysninger ville blive meddelte i en særskilt Afhandling. Der blev experimenteret saavel med yngre som med ældre Hindedannelser, alle udviklede i Urt-Kulturer ved Værelsets Temperatur, altsaa under Forhold, der, saa vidt jeg kan skjønne, vare de samme som de, hvorunder Pasteur opererede. De benyttede Kolber vare dels Pasteur's dels Chamberland's Model. Hver Arts Hindedannelse blev for sig benyttet til Infektion af ny steriliseret Urt; der blev altsaa her ligesom tidligere bestandig arbejdet med Renkulturer. Mine Forsøg kunne henføres til to Grupper. I den ene var Udsæden ikke blot i de første, men tillige i alle de følgende Kolber Hindevegetationer. Det vil sige, den med en Hindevegetation inficerede Kolbe, a, blev staaende, indtil den selv havde udviklet Hinde; med denne Hinde inficeredes Kolben, b, der derpaa atter blev staaende, indtil i den en Hinde var dannet, hvorpaa Infektion paa lignende Maade foretoges herfra

---

[1]) Emil Chr. Hansen, Sygdomme i Øl, fremkaldte af Alkoholgjærsvampe. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, II B., 2 Hefte, 1883, p. 95 o. flg.).

til c, o. s. v. Infektionen skyldtes altsaa bestandig de nydannede Hinder, der overførtes fra Kolbe til Kolbe gjennem et stort Antal Led. I den anden Gruppe derimod stammede kun Infektionen i hver Arts første Kolbe fra en Hindedannelse. Med den herved dannede Bundgjær blev, forinden ny Hinde havde udviklet sig, den næste Kolbe inficeret, og med dennes Bundgjær atter den tredie o. s. v. Infektionen i hver Rækkes Led i denne Gruppe, med Undtagelse af det første, stammede følgelig fra en Bundgjærmasse. Begge Grupper af Dyrkningsforsøgene bleve udførte saavel ved almindelig Stuevarme som ved c. 26° C., kort sagt under Forhold, som efter Alt, hvad vi vide, maa betegnes som særligt gunstige til at fremkalde Overgjæringsfænomener. Disse traadte imidlertid kun frem i de Tilfælde, hvor den oprindelige Udsæd var en Overgjærform. Hindedannelserne af alle Undergjærformerne, sex Arter, udviklede bestandig kun Undergjær.

Ifald Pasteur's levûre aérobie er det Samme som min Hindedannelse, og der ikke derunder skjules et for mig ukjendt Fænomen, maa jeg antage, at den Undergjær, hvormed han anstillede sine Forsøg, har været blandet med Overgjær. Da det udtrykkelig fremhæves, at de iagttagne Omdannelser ikke vare af foreløbig Natur, kan det ikke antages, at han har ladet sig skuffe af det Forhold hos Saccharomyceterne, at de efter en vis Behandling kunne vise Overgjæringsfænomener gjennem nogle faa Gjæringer, hvorefter de atter vende tilbage til det Normale. Det er ikke blot i Laboratoriet, at saadanne Iagttagelser kunne gjøres, men ogsaa i Bryggeriet. I Sommeren 1884 havde saaledes Hr. Bryggeridirektør Kühle opbevaret nogle Portioner af Carlsberg's rene Undergjær, Nr. 2, dels i Øl, dels i Urt og dels som udvasket Pressegjær 3—4 Uger i en af Bryggeriets Isbeholdere. Da denne Gjær derefter blev sat til Urt i Gjæringskjælderen, gav den her strax en hidsig Gjæring med tydelige Overgjæringsfænomener. For at prøve, om den opløftede Gjær virkelig skulde bestaa af en Overgjærform, afskummede han den for sig alene og satte den til ny Urt. Det viste sig da, at den i alle Retninger forholdt sig som normal Undergjær. Den fysiologiske Omdannelse, der i Forsøgets Begyndelse iagttoges, var følgelig ikke konstant, men forsvandt hurtig. Omvendt kan man indvirke saaledes paa typiske Overgjærformer, at de gjennem flere Generationer vise sig som Undergjær, men ogsaa i disse Tilfælde er der kun Tale om en foreløbig Omdannelse. Mine Undersøgelser gaa altsaa, hvordan jeg end søger at tage Sagen, bestemt imod Pasteur's.

Ifølge Pasteur have levûre aérobie-Cellerne ingen særlig Evne til Variation, og det siges om dem, at de i Formen stemme overens med Cellerne af den tilsvarende Udsæd og med den deraf dannede Bundgjær. At dette, hvad mine Hindedannelser angaar, kun har en meget betinget Gyldighed, ses tydeligt ved blot at kaste et Blik paa Tavlerne til min Afhandling. Den Uoverensstemmelse, der paa dette Punkt er mellem Pasteur's og mine Resultater, kan maaske delvis finde sin Forklaring deri, at Pasteur's Experimenter kun bleve anstillede ved almindelig Stuevarme, og at han muligvis indskrænkede sine mikroskopiske Undersøgelser til de første Udviklingsstadier.

Efter Pasteur fremvise Gjærarternes levûre aérobie et forskjelligt Ydre, saa at man alene derved skal kunne skjelne den ene fra den anden. Dette var, som tidligere meddelt, ikke Tilfældet med de af mig undersøgte Hindedannelser. Selv om vi ligesom Pasteur kun anstille Forsøgene ved almindelig Stuevarme, finde vi, at Differensen mellem de sex Arter i den nævnte Retning kun viser sig deri, at der hos nogle indtræder en kraftigere og hurtigere Udvikling end hos andre.

Har Pasteur i sin levûre aérobie havt samme Fænomen for sig, som jeg i mine Hindedannelser, saa er der altsaa væsentlige Differenser i vore Resultater. Vi indtage overhovedet i vore Studier af Alkoholgjærsvampene forskjellige Standpunkter; Grunden hertil er tildels den, at Pasteur er gaaet til Opgaven fornemmelig som Kemiker, jeg derimod som Botaniker.

Hvis Pasteur's levûre aérobie er det Samme som mine Hindedannelser, saa er Navnet levûre aérobie uheldig valgt. P. 115 i det foran nævnte Værk giver han nemlig selv den Definition deraf, at det skal betegne Organismer, som ikke kunne leve uden Luft; men om mine Hinders Celler vide vi jo, at de, naar de nedsænkes i gjæringsdygtige Vædsker, her kunne udføre deres Gjæringsvirksomhed uden at have Adgang til fri Ilt. Det er vel sandt, at en rigelig Lufttilførsel begunstiger Udviklingen af Hinderne, men dette gjælder ogsaa for Knopskydningen og ligeledes i en høj Grad for Askosporedannelsen. Hvad sidstnævnte Funktion angaar, finder jeg i mine endnu ikke offentliggjorte Optegnelser følgende i den Retning oplysende Iagttagelser: Sacch. ellipsoideus II og mine tre Arter af Gruppen Pastorianus bleve hver for sig tilligemed nogle Draaber af den gjærende Urt, hvori de vare dyrkede, anbragte paa en større Række Objektglas. Halvdelen af disse Kulturer bleve derpaa strax stillede ind under en fugtig Glasklokke; Draaberne paa de øvrige Objektglas bleve derimod først dækkede

hver med sit Dækglas, hvorpaa ogsaa disse Kulturer bleve stillede ind i et lignende fugtigt Rum. Arbejdet blev udført saaledes, at der ikke indtraadte en Infektion udenfra. Efter nogle faa Dages Forløb viste det sig da, at mange af Cellerne i enhver af de ikke bedækkede Draaber havde dannet endogene Sporer, men derimod ingen af Cellerne i de bedækkede, og efter 17 Døgn fandtes endnu ikke en eneste Celle med Askosporer i disse fra Luften afspærrede Kulturer. — Det Væsentligste for Hindedannelsen er forøvrigt ogsaa den frie, rolige Overflade og ikke Lufttilførselen. Lade vi f. Ex. Luft med tilstrækkelig Kraft uafbrudt boble igjennem vore med Gjær inficerede Næringsvædsker, vil der slet ikke indtræde nogen Hindeudvikling. Blot ved af og til at ryste Vædsken kunne vi bevirke, at denne Dannelse ikke finder Sted.

Det andet Navn, levûre-moisissure, er ligeledes næppe heldig valgt. For det Første er det endnu bestandig meget tvivlsomt, om Saccharomyceterne, hvorom Talen idetmindste for mit Vedkommende bestandig er, ere Udviklingstrin af Skimmelformer eller ej; det er nemlig hidtil gaaet Forskningen hermed som med generatio spontanea, at alle de Beviser, der fremførtes til Støtte for denne Opfattelse, ikke have kunnet udholde en exakt Prøve. Dernæst er det et aabent Spørgsmaal, om Gjærceller, naar de i Hindevegetationer leve paa Vædskens Overflade, udføre lignende kemiske Omsætninger, som ægte Skimmelvegetationer; de Undersøgelser, jeg i den Retning har paabegyndt, ere dog ikke tilstrækkelig fremskredne til, at jeg i Øjeblikket kan udtale mig nærmere derom. Af andre Grunde, der tale imod at indføre nye Navne for vort Fænomen, kan ogsaa fremhæves den, der allerede blev dragen frem i Indledningskapitlet til nærværende Afhandling, nemlig at Hindedannelsen hos Saccharomyceterne ikke er en for disse særegen Udviklingsform, men derimod et i Mikroorganismernes Verden almindeligt Fænomen.

Er Pasteur's levûre aérobie imidlertid et helt andet Fænomen end det af mig i nærværende Afhandling behandlede, og betegnes dermed ejendommelige, selvstændige Gjærarter, som idetmindste en af Mesterens Diciple har opfattet det, saa er naturligvis ovenstaaende Undersøgelse af Navnenes Værdi overflødig. Det er værd at lægge Mærke til, at De Bary i sit berømte Værk, Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, ligesom med Flid har undgaaet at benytte dem.

Aarsagen til, at vi ikke af Pasteur's Bog med Sikkerhed kunne afgjøre, hvad der egentlig er Tale om, er væsentlig den, at det, som det flere Steder, f. Ex. p. 179 og navnlig i den citerede

Anmærkning p. 205, klart og tydeligt siges, ikke var muligt at bestemme, om der i hver af Kolberne fandtes eet eller flere Species. En anden Grund til Usikkerheden er den, at det hverken i Afsnittet om levûre aérobie eller overhovedet paa noget Punkt afgjøres, om der er Tale om Saccharomyceter eller kun om saccharomyceslignende Celler. Ordene Saccharomyces og levûres betegne nemlig hos Pasteur Alkoholgjærsvampe i Almindelighed med udpræget Gjæringsevne og med Gjærcellers sædvanlige Knopskydning, altsaa Svampe, der kunne henhøre til meget forskjellige Afdelinger i vort nuværende System. De ere efter hans Opfattelse (p. 164, 165, 177) Udviklingsformer af visse, endnu dog ikke nærmere kjendte dematiumagtige Skimmelsvampe. Om det hermed i nøje Forbindelse staaende Spørgsmaal om Species har Pasteur ikke udtalt nogen bestemt Anskuelse. Paa nogle Steder, f. Ex. p. 147, synes hans Mening at være den, at de nævnte Organismer optræde med konstante Species-Mærker, paa andre, f. Ex. p. 193, maa den opmærksomme Læser derimod faa det Indtryk, at de have en ubegrændset Evne til Variation, og at Species ikke findes iblandt dem. I det af os navnlig undersøgte Afsnit om levûre aérobie komme begge disse modstridende Meninger til Orde.

For at forstaa det berømte Værk rigtigt, maa vi imidlertid bestandig fastholde, at dets Opgave paa dette Omraade kun var at give en Række foreløbige Undersøgelser. At gjennemføre disse var tilmed næppe muligt paa det Standpunkt, hvorpaa Videnskaben den Gang befandt sig, og siden har, som Alle vide, den store Forskers Kraft været indviet til helt andre Opgaver, — Opgaver, ved hvis Løsning Pasteur har erobret en ny Verden for Lægekunsten og Biologien.

Tilbageblik.

I det første Afsnit af denne Afhandling blev det vist, at Hindedannelsen er et meget almindeligt Fænomen i Mikroorganismernes Verden, og at den optræder saavel hos Bakterierne som hos de egentlige Svampe og hos Former henhørende til forskjellige Afdelinger i Systemet (p. 168—173).

Ogsaa hos Saccharomyceterne iagttoge vi denne Dannelse, og vi lærte navnlig, at Vegetationerne i de gamle Kulturers Hinder under de angivne Dyrkningsforhold udvikle mere langstrakte Celler og i Reglen tillige mere sammensatte Kolonier, end der fandtes i

den tilsvarende Udsæd; Systemets Sacch. cerevisiæ og Sacch. ellipsoideus bleve herved omdannede til Sacch. Pastorianus; en Udvikling af traadformede og bakterielignende Celler traadte ogsaa frem (p. 173—176 og Figurerne 3 paa Tavlerne III—VIII). Disse Iagttagelser bleve Udgangspunktet for planmæssige Experimenter med de i mine tidligere Afhandlinger omhandlede sex Arter.

Vi fandt, at en af Betingelserne for, at en kraftig Udvikling i den nævnte Retning skal indtræde, er, at vedkommende Gjærart har rigelig Adgang til atmosfærisk Luft. Forsøgene bleve derfor anstillede i halvfyldte Kogeflasker, der vare overbundne med steriliseret Filtrerpapir, og der blev endvidere benyttet en gunstig Næringsvædske, nemlig Ølurt (p. 176—177).

Ved at underkaste Udsædens Celler fra ensartede Renkulturer en mikroskopisk Undersøgelse fandt vi, at de kunne henføres til tre Afdelinger, hvoraf den ene omfatter Sacch. cerevisiæ I, den anden de tre Arter af Gruppen Sacch. Pastorianus, og den tredie de to Arter af Gruppen Sacch. ellipsoideus (p. 177—178 og Tavle I—II).

Tabellerne p. 179—181 gave os en Oversigt over Hindeudviklingen ved forskjellige Temperaturer. Vi lærte navnlig heraf, at de første Udviklingsstadier ved 13—15° C., der ere aftegnede i Figurerne 2, Tavle IV - VIII, og i Fig. 1 paa Tavle III, frembyde iøjnefaldende Differenser mellem flere af Arterne. Særlig vigtig for os er, at de to Arter, Sacch. Pastorianus II og Sacch. Pastorianus III, som begge ere Overgjærformer, og hvis Udsæds Celler ikke med Sikkerhed kunne skjelnes fra hverandre, her optræde med aldeles forskjellige Vegetationer; det Samme gjælder ligeledes om de to i Udsæden ensartede Arter, Sacch. ellipsoideus I og Sacch. ellipsoideus II. Interessant er det endvidere at se, hvorledes den ved sine ovale Celler i Udsæden typiske Sacch. ellipsoideus I her har dannet mycelielignende Kolonier og er bleven til en af Systemets Sacch. Pastorianus, medens derimod det Omvendte har fundet Sted med Sacch. Pastorianus II. Ligeledes lærte vi, at Udviklingen foregaar med forskjellig Hurtighed og Kraft hos de forskjellige Arter, og at deres Temperaturgrændser i den Retning ogsaa ere forskjellige (p. 179—185).

Vi erfarede, at Knopskydningen og Gjæringen finde Sted udover en Temperatur, ved hvilken under lignende Omstændigheder ingen Udvikling af Hinde kan indtræde, og at de Arter, som have de højeste Temperaturmaxima for de to førstnævnte Funktioner ogsaa have dem for Hindedannelsen (p. 186).

Ved at undersøge Bundgjæren i de beskrevne Dyrkningsforsøg saa vi, at den i nogle Tilfælde var dejgagtig, i andre derimod hindeagtig foldet eller osteagtig, og vi lærte, at samme Art ved en vis Behandling kan bringes til at udvikle enhver af disse Bundgjærformer. Ogsaa Formforskjelligheder af systematisk Værdi traadte her frem hos Cellerne, og vi erfarede paany, at samme Art under forskjellige ydre Indvirkninger kan optræde paa helt forskjellig Maade, med helt forskjelligt Præg; men omvendt viste det sig tillige, at der er Grændser for denne Indvirkning, og at vore sex Arter reagere forskjellig (p. 186—188).

Et af de praktiske Resultater af mine Undersøgelser bestaar deri, at der herigjennem har udviklet sig en Methode til Analyse af Bryggerigjær. Ogsaa ovenstaaende nye Undersøgelser yde Bidrag i den Retning. Disse saavelsom mine øvrige for den store Praxis gjennemførte Arbejder staa eller falde med den Forudsætning, at Saccharomyceterne optræde som Species, Varietet eller Race, og at der, kort sagt, er Konstans i de af mig udfundne Karakterer. Det var derfor ogsaa herimod, at Hovedangrebet blev rettet fra mine ærede Modstandere i Berlin (p. 188—192).

Medens den første Del af andet Kapitel fortrinsvis omfatter det gjennem alle mine Studier over Mikroorganismerne gaaende Hovedspørgsmaal om Species og disses Begrændsning, gives derimod i Slutningen en Række forskjellige Oplysninger i andre Retninger: Om den Affarvning, som Hinderne fremkalde i vedkommende Ølvædske (p. 192); Iagttagelser over den Indflydelse, som Næringsvædskens kemiske Sammensætning har paa Udviklingen af Hinderne og paa Formen af disses Celler (p. 193—195); Undersøgelser over Dannelsen af endogene Sporer (p. 195) og af Cellekjærne i Hindens Celler (p. 198), og Undersøgelser over de af mig for et Par Aar siden opdagede gelatinøse Dannelser hos Gjærceller (p. 198—200).

Om mine Forgængeres Bidrag til Kundskaben om Hindeudviklingen hos Saccharomyceterne handles p. 200—207. De første Antydninger om Vegetationer af den Art fandt vi hos Reess. Udførligere Bidrag indeholdes i Pasteur's berømte Værk, Études sur la bière. Ved første Betragtning synes det nemlig, at Pasteur's levûre aérobie eller levûre moisissure maa være det Samme som mine Hindedannelser; et nøjere Studium viser os dog den store Uoverensstemmelse, og der opstaar Tvivl derom. Medens Pasteur paa nogle Steder synes at have den Opfattelse, at hans nye Gjær er en Udviklingsform af den almindelige Bundgjær, henviser han derimod paa andre til den Mulighed, at levûre-aérobie-Formerne

kunne tænkes at have været tilstede som skjulte Indblandinger i de Gjærmasser, hvormed han anstillede sine Forsøg (p. 201); i dette Tilfælde ere de følgelig ejendommelige, selvstændige Gjærarter, og Pasteur har da havt et helt andet Fænomen for sig end det af mig behandlede. Det indgaaende Studium, som Kapitlet om levûre aérobie i den store Forskers Værk blev underkastet, har overhovedet atter vist, at vi i vore Undersøgelser over Alkoholgjærsvampene indtage forskjellige Standpunkter.

Forklaring over Tavlerne.

Alle Figurerne ere forstørrede 1000 Gange lineært. Paa Tavle I og II er der afbildet unge, kraftige Vegetationer i almindelig Bundgjær fra Kulturer i Ølurt (p. 177). Tavlerne III—VIII fremstille de deraf ved forskjellige Temperaturer og i forskjellig Tid udviklede Hindevegetationer (p. 173—184).

Tavle I.

Fig. 1. Saccharomyces cerevisiæ I. p. 177.
- 2. Saccharomyces Pastorianus I. p. 177.
- 3. Saccharomyces Pastorianus II. p. 177.

Tavle II.

Fig. 1. Saccharomyces Pastorianus III. p. 177.
- 2. Saccharomyces ellipsoideus I. p. 178.
- 3. Saccharomyces ellipsoideus II. p. 178.

Tavle III.

Saccharomyces cerevisiæ I. p. 173, 179, 181.

Fig. 1. Hindevegetationerne ved 15—6° C.
- 2. Hindevegetationerne ved 34—22° -.
- 3. Hindevegetationerne i gamle Kulturer.

Tavle IV.

Saccharomyces Pastorianus I. p. 174, 179, 181.

Fig. 1. Hindevegetationerne ved 28—20° C.
- 2. Hindevegetationerne ved 15—3° -.
- 3. Hindevegetationerne i gamle Kulturer.

I Fig. 1 ere nogle af de langstrakte Celler blevne mindre heldigt gjengivne.

Tavle V.

Saccharomyces Pastorianus II. p. 174, 180, 181.

Fig. 1. Hindevegetationerne ved 28—20 ° C.
- 2. Hindevegetationerne ved 15—3 ° -.
- 3. Hindevegetationerne i gamle Kulturer.

Tavle. VI.

Saccharomyces Pastorianus III. p. 174, 180, 182.

Fig. 1. Hindevegetationerne ved 28—20 ° C.
- 2. Hindevegetationerne ved 15—3 ° -.
- 3. Hindevegetationerne i gamle Kulturer.

Tavle VII.

Saccharomyces ellipsoideus I. p. 174, 180, 182.

Fig. 1. Hindevegetationerne ved 34—20 ° og 6—7 ° C.
- 2. Hindevegetationerne ved 15—13 ° C.
- 3. Hindevegetationerne i gamle Kulturer.

Tavle VIII.

Saccharomyces ellipsoideus II. p. 175, 180, 182.

Fig. 1. Hindevegetationerne ved 38—20 ° C.
- 2. Hindevegetationerne ved 28—3 ° -.
- 3. Hindevegetationerne i gamle Kulturer.

1.



2.



3.



Emil Chr Hansen ad nat del

Lövendal sc

1.



2.



3.



Emil Chr. Hansen ad nat. del.

Lövendal sc.







Emil Chr Hansen ad nat del

Lovendal sc

1.



2.



3.



Just Chr Holm ad nat del

Lovendal sc

1.

2.

3.

Just Chr Holm ad nat del

Lovendal sc

1.



2



3.



Emil Chr. Hansen ad nat. del.

Lovendal sc.

Tab. VII

1

2.

3.

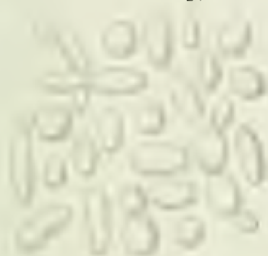
Just Chr Holm ad nat del

Lovendal sc

1.



2.



3.

Emil Chr. Hansen ad nat del

Løvendal sc

Hvor ringe en Infektion af „vild" Gjær kan efter Hansens Methode paavises i en Undergjærmasse af S. cerevisiæ?

(2den Meddelelse).

Af

Just Chr. Holm og S. V. Poulsen.

Efterat vi i vor forrige Meddelelse om dette Spørgsmaal kun havde behandlet Forholdet ligeoverfor een Kulturart, nemlig den i Bryggeriet »Gamle Carlsberg« og i skandinaviske Bryggerier overhovedet fortrinsvis benyttede Carlsberg Undergjær Nr. 1, laa det nær at underkaste andre Kulturarter den samme Prøve for at se, i hvilken Udstrækning den anvendte Temperatur lod sig benytte.

Dette blev da Gjenstand for den første Del af de nye Undersøgelser, som her offentliggjøres.

I sine Undersøgelser over de paa Gl. Carlsberg anvéndte Gjærarter havde Dr. Hansen fundet, at Gjærarten Carlsberg Undergjær Nr. 2 ikke saaledes som Carlsberg Undergjær Nr. 1 kan analyseres ved 25° C., men derimod ved en Temperatur af 15—16° C. Dette Resultat meddelte han blandt andet i de Forelæsninger, som han i de senere Aar har holdt her paa Laboratoriet for fremmede Zymotechnikere, og det er saaledes ogsaa gaaet over i Literaturen, idet det f. Ex. omtales i Jörgensens: »Die Mikroorganismen der Gährungsindustrie«.

Heri fandt vi det andet Udgangspunkt for vore Undersøgelser.

Endvidere ere under Arbejdet andre mindre Spørgsmaal dukkede op, for hvilke vi ogsaa i denne Meddelelse skulle gjøre Rede.

Til vore nye Forsøg benyttede vi dels Carlsberg Undergjær Nr. 2 dels en Del andre (18) rendyrkede, paa maa og faa ud-

valgte Undergjærarter, som imidlertid alle havde været prøvede i Driften i Bryggerier, dels herhjemme og dels i Udlandet, og befundne at være gode. Det fremhæves her udtrykkelig, at vi saaledes ikke blot sikrede os, at vi bestandig arbejdede med prøvet Kulturgjær, men at vi ogsaa søgte at inddrage et stort Antal Arter i vor Prøve, idet vor Opgave jo netop var, om muligt at finde Tilfælde, hvor Methoden ikke lod sig anvende.

Ved denne Lejlighed bemærkes, at, medens der ved Carlsberg Undergjær Nr. 1 (ikke at forvexle med Hansens Sacch. cerivisiæ I) overalt, baade paa Gl. Carlsberg og i andre Bryggerier, betegnes en eneste aldeles bestemt Gjærart, nemlig den, hvormed Hansen i Slutningen af 1883 indførte Renkulturen i Bryggeridriften, betegnes der ved Carlsberg Undergjær Nr. 2 ikke en, men flere forskjellige Arter, som efterhaanden ere blevne prøvede i det nævnte Bryggeri.

Blandt de andre Kulturarter, hvormed disse Forsøg gjordes, ville vi særlig nævne følgende:

Hofbräuhaus Gjæren og Augustinerbräuhaus Gjæren, der ere fremstillede af Dr. Will i »Wissenschaftliche Station für Brauerei« i München, og som i det sydlige Udlands store Bryggerier, f. Ex. Spaten Bryggeriet i München, spille en lignende betydelig Rolle som Carlsberg Undergjær Nr. 1 i de skandinaviske Bryggerier, endvidere den Gjær, som er fremstillet af Dr. Elion og almindelig anvendes i Heineckens Bryggerier i Amsterdam og Rotterdam. En stor Del af de øvrige Arter skyldes Hr. Laboratorieforstander Jørgensen. Om Hofbräuhaus- og Augustinerbräuhaus Gjæren har Will meddelt Oplysninger i »Zeitschr. für das ges. Brauwesen« 1887, Nr. 16. Med flere af de i vor Afhandling omhandlede Arter bleve kemisk-physiologiske Undersøgelser anstillede af E. Borgmann (Zeitschr. f. analyt. Chemie XXV. Heft IV p. 532) og K. Amthor (Zeitschr. f. physiol. Chemie XII. p. 64). Herved traadte blandt andet dette frem, at Arterne ogsaa i denne Retning viste betydelige Differenser.

Ligesom i vor første Meddelelse bleve Forsøgene anstillede med de 3 Arter: Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III og Sacch. ellipsoideus II som Indblanding, om hvilke det gjennem Hansens Undersøgelser som bekjendt blev vist, at de foraarsage Sygdomme i Øl; de ere tilmed de eneste Arter, hvorom dette vides[1]).

---

[1]) For nylig har Grønlund (»Zeitschr. für das ges. Brauwesen« 1887 Nr. 21) i et af de Bryggerier, med hvilke han staar i Forbindelse,

Det er af Vigtighed at erindre, at Dyrkningen af Gjæren — baade af Kulturarterne og af de nævnte Sygdoms-Gjærformer — nøjagtig foregaar saaledes, som den er bleven foreskreven af Hansen i hans for alle disse Analyser til Grund liggende Arbejde: Om Askosporedannelsen hos Slægten Saccharomyces (II B. 2 Hefte, 1883 p. 65).

Hvad den første Del af vore Undersøgelser angaar, nemlig Spørgsmaalet om, hvorvidt der imellem de i vore Forsøg inddragne Kulturarter fandtes nogle, som i Lighed med den tidligere undersøgte Carlsberg Undergjær Nr. 1 kunde lade sig analysere ved 25° C., viste det sig, at der af de 19 Former, som nu prøvedes, fandtes 5, som lod sig analysere efter 40 Timer ved denne Temperatur. Disse stillede sig atter forskjelligt med Hensyn til Tiden, paa hvilken Askosporerne fremkom, hvilket tydeligt nok viste, at det var forskjellige Arter, med hvilke der opereredes; en dannede saaledes sine Askosporer efter 3 Døgn, medens andre først udviklede disse efter 5 Døgn (ved 25—26½° C.). Her skal bemærkes, at Carlsberg Undergjær Nr. 1, der danner Typen for disse Arter med Hensyn til Tiden, paa hvilken Askosporerne udvikles ved 25° C., efter 4 Døgn endnu ikke giver Askosporer, ligesom den i det hele taget kun udvikler disse Dannelser i meget ringe Grad, hvad der allerede er meddelt tidligere, først af Hansen og senere af Jørgensen og Will, ligesom det ogsaa er omtalt i vor første Meddelelse.

Hovedresultatet paa dette Punkt blev altsaa, at der iblandt de 19 undersøgte Arter fandtes 5, der ligesom Carlsberg Undergjær Nr. 1 kunne analyseres ved 25° C.

Vi komme nu til det andet Hovedpunkt i vor Undersøgelse: Kunne de øvrige Kulturarter, som ikke lade sig analysere ved 25° C., analyseres ved den for Carlsberg Undergjær Nr. 2 fundne Temperatur 15—16° C., eller maa der søges andre Temperaturer?

Inden vi indlade os paa denne Undersøgelse, maa vi først spørge om, hvorledes Hansens tre Sygdoms-Gjærformer i dette Tilfælde forholde sig. Med Hensyn til Sacch. Pastorianus I indtræder Askosporedannelsen ved 15° C. efter 50 Timer (ifølge Hansens ovenfor citerede Afhdl.). Vi have fundet, at den ved

---

iagttaget en af disse Arter i sygt Øl, nemlig Sacch. Pastorianus I. Ved de Forsøg, som han anstillede med den, blev Rigtigheden af Hansens Resultater bekræftede. Denne Art synes at være hyppig, og den hører aabenbart til en af de allerfarligste Sygdomsformer i Undergjærings Bryggerier.

$15^1/_2{}^0$ C. kan paavises ved en Indblanding af kun 1 % med Lethed efter 72 Timer, medens $^1/_2$ % under de samme Omstændigheder vel kan paavises, men dog med nogen Vanskelighed. Sacch. Pastorianus III danner ved 16^0 C. (ifølge Hansen) Askosporer efter 53 Timer; ved vore Undersøgelser har det vist sig, at den ved $15^1/_2{}^0$ C. ligesom den forrige ved en Indblanding af 1 % let kan paavises efter 72 Timer, ved $^1/_2$ % derimod vanskeligere. Det samme gjælder ogsaa om Sacch. ellipsoideus II, for hvilken ingen Angivelse findes ved 15—16^0 i ovennævnte Afhandling, men om hvilken vi have fundet, at den ved $13^3/_4$—15^0 C. danner Askosporer efter næppe 3 Døgn. Disse Former kunne altsaa alle efter 72 Timer paavises endog ved en Indblanding af kun 1 %, og selv ved $^1/_2$ % Indblanding er dette muligt om end med nogen Vanskelighed.

Saafremt altsaa de af os undersøgte Kulturarter, som ikke lade sig analysere ved 25^0 C., forholde sig som Carlsberg Undergjær Nr. 2, vil det kunne lade sig gjøre ligeoverfor disse at anvende en Temperatur af 15—16^0 C. til Brug ved Analysen. Idet de undersøgtes ved 15—16^0 C., viste det sig, at Halvdelen (7 af 14) af dem først udviklede Askosporer efter 4 Døgn (hertil hører blandt andet Carlsberg Undergjær Nr. 2), dette var det hyppigste; af Resten fremkom hos enkelte disse Dannelser endog først efter 5—6 Døgn, men der fandtes ogsaa nogle (4), hos hvilke Askosporedannelsen indtraadte tidligere end 4 Døgn. Til disse høre bl. a. Hofbräuhaus Gjæren, Augustinerbräuhaus Gjæren og Elions Gjær. Den af disse Arter, hvis Askosporer ved denne Temperatur udvikles tidligst, er Augustinerbräuhaus Gjæren, som ved 15^0 C. giver Askosporer efter 82 og ved 16^0 C. efter 73 Timers Forløb, derefter kommer Hofbräuhaus Gjæren, som ved 15^0 C. giver Askosporer efter 90 og ved 16^0 C. efter 72 Timer, medens Elions Gjær først udvikler disse Dannelser efter 95—97 Timer ved en Temperatur af 15—16^0 C. Vi se altsaa, at en Temperatur af 15—16^0 C. vel i de fleste, men ikke i alle Tilfælde er passende, medens derimod en Temperatur af 15^0 C. og en Analyse efter 72 Timer vil kunne anvendes for alle vore 14 Former.

Resultatet af denne Del af vor Undersøgelse er altsaa dette: at de 14 af de 19 Kulturarter, altsaa det langt overvejende Antal, slutte sig, hvad Analysen angaar, nærmest til Carlsberg Undergjær Nr. 2, de kunne altsaa prøves ved 15^0 C., idet de vilde Former her have dannet deres Askosporer efter 72 Timer, Kulturformerne tid-

ligst efter 82—90 Timer og i Reglen meget senere. Dette gjælder for Indblandinger af indtil 1 %—½ %, dog er Undersøgelsen med den sidstnævnte ringe Indblanding vanskelig.

Vor Undersøgelse er imidlertid ikke alene gaaet ud paa at bestemme Tiden for Askosporedannelsen hos Kultur-Undergjærarterne ved de omtalte Temperaturer 25° og 15° C. Ved flere andre Temperaturer mellem 35° og 10° C. ere lignende Undersøgelser foretagne, og der viste sig da ogsaa ved disse stor Forskjel for de forskjellige Arters Vedkommende, navnlig naar Hensyn toges til Maximums- og Minimumstemperaturerne. Der var saaledes Former, som ved 11—12° C. udviklede Askosporer efter 6 Døgn, andre først efter 9—10 Døgn — og dette var det almindelige —, medens andre først udviklede disse efter 12—14, ja endog først efter 17 Døgn, atter andre havde endnu efter 20—24 Døgns Forløb intet Spor af disse Dannelser. Ligeledes udvikledes hos nogle Former ved 30°—32° C. Askosporer efter 2—3 Døgn, medens andre ved disse Temperaturer overhovedet ikke frembragte Askosporer.

Der kunde nu spørges, om der blandt disse Temperaturer ikke fandtes nogle, som kunde anvendes ved Analysen, og vi ville da først betragte Temperaturen ved c. 30° C. For en enkelt af Sygdoms-Gjærformernes Vedkommende, nemlig Sacch. ellipsoideus II, vil en Analyse ved denne Temperatur have sin store Betydning; denne Form er nemlig den værste, hvad Sygdommen Gjærtykhed angaar (se Hansens Afhandling: »Sygdomme i Øl, fremkaldte af Alkoholgjærsvampe«, 2 B. 2 Hefte p. 93). Om ovennævnte Form vide vi ifølge Hansens tidligere citerede Afhandling, at den ved 29—31½° C. udvikler Askosporer efter 22—23 Timer, og ifølge vore Undersøgelser kan den ved 30° C. paavises efter 43 Timer, selv ved en Indblanding af kun 1 % og ½ %.

Det vil altsaa være muligt at paavise en Infektion af denne Art hos dem af vore Kulturformer, som ved den nævnte Varmegrad enten først efter 3 Døgn eller endnu senere eller slet ikke udvikle Askosporer. Af de 14 Former, som kunne analyseres ved 15° C., kunne ifølge vore Undersøgelser 9 tillige analyseres ved 30° C., om de 5, som kunne analyseres ved 25° C., vide vi sikkert, at 1 er istand dertil, og maa formode, at det for de andres Vedkommende ogsaa er Tilfældet; endelig kan Carlsberg Undergjær Nr. 1 ogsaa regnes med til disse, saaledes at vi i alt faa 15 af 20, som, naar Spørgsmaalet er om en Infektion af Sacch. ellipsoideus II, lade sig analysere ved 30° C. for denne Syg-

domsgjær selv ved en saa ringe Indblanding som 1 %—½ % efter et Tidsrum af 43 Timer.

Der kunde endelig være Tale om, om man ikke ogsaa ved en lavere Temperatur end 15° C. kunde foretage Analysen for vild Gjær, og vi have da undersøgt, hvorledes Forholdet stiller sig ved 12° C.

Ved denne Temperatur danner Sacch. Pastorianus I Askosporer efter 68 Timer og kan efter 4 Døgn paavises ved en Indblanding af 1 %—½ %. Sacch. Pastorianus III danner Askosporer efter 3 Døgn, men kan først paavises efter 5¾ Døgn ved en Indblanding af 1 %—½ %. Sacch. ellipsoideus II danner ligeledes Askosporer efter 3 Døgn, men kan ved en Indblanding af 1 % først paavises efter 4¾ Døgn og ved en Indblanding af ½ % først efter 5¾ Døgn. Det maa imidlertid strax bemærkes, at det er forbundet med stor Vanskelighed at konstatere saa ringe Indblandinger.

Vore Kulturformer udvikle, som allerede ovenfor bemærket, i Almindelighed deres Askosporer paa et senere Tidspunkt ved denne Temperatur, saafremt de overhovedet ere i Stand dertil, men der findes dog ogsaa Former, hvor Askosporedannelsen indtræder omtrent lige saa tidligt (efter 6 Døgn) som hos Sygdoms-Gjærformerne; disse lade sig naturligvis ikke analysere ved denne Temperatur. Dette er saaledes Tilfældet med 3 af vore 19 Kulturracer; for de andres Vedkommende have vi fundet, at Analysen vil kunne foretages med 11 af de Former, som lade sig analysere ved 15° og med 3 af de Former, som kunne analyseres ved 25°. Resten af disse kunne derimod ikke analyseres ved 12° C. Vi faa i saa Tilfælde i alt 14 Former, for hvilke den omtalte Temperatur vil kunne benyttes til Analyse efter 6 Døgns Forløb, dog vil det vistnok ofte være forbundet med store Vanskeligheder at paavise en ringere Indblanding end 2 %; at det imidlertid kan lade sig gjøre, vise vore Forsøg.

Ihvorvel denne Temperatur altsaa i de fleste Tilfælde kan anvendes, vil Analysen her dog altid for Praxis komme til at spille en mindre væsentlig Rolle, og man vil i alle de Tilfælde, hvor den for Analysen gunstigste Varmegrad 25° C. ikke kan benyttes, vælge 15° C. Grundene til, at man i Almindelighed ikke vil anstille Analysen over Indblandinger af vild Gjær ved 12° C., ere disse:

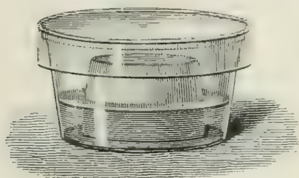
For det første findes der, som nylig angivet, Kulturarter, som ikke lade sig analysere ved denne Temperatur. For det andet tager Analysen ved 12° C. længere Tid end ved 15° og 25° C.,

og det er derfor naturligt at vælge disse, da tilmed, som vi have set, alle de Former, der kunne analyseres ved 12° C., tillige kunne analyseres enten ved 15° eller ved 25° C. For det tredie kan Analysen her ikke udføres med den Finhed som ved de højere Temperaturer; ringere Infektioner end 2 % ville kun med største Vanskelighed kunne paavises; selv naar Talen er om en stærkere Infektion vil det i mange Tilfælde frembyde en Del Besvær at paavise denne. Det er nemlig, som vi allerede i vor første Meddelelse berørte, altid kun et vist Procentantal af Celler, som danne Askosporer, men dette Tal bliver end yderligere reduceret, naar man som her ved 12° C. nærmer sig stærkt til de Grændser, udenfor hvilke Cellerne overhovedet ikke formaa at frembringe disse Dannelser. Dette er Tilfældet for 2 af Sygdoms-Gjærformernes Vedkommende, Sacch. Pastorianus III og Sacch. ellipsoideus II, hvis Minimumstemperaturer ligge mellem 4° og 8° C., medens den tredie, Sacch. Pastorianus I, endnu ved en meget lavere Temperatur (3°—4° C.) kan udvikle Askosporer (Minimumstemperaturen er her mellem ½° og 3° C.); denne Form er derfor ogsaa den letteste at paavise ved denne Temperatur.

Det drejer sig imidlertid, naar Talen er om Analyser ved 15° og 12° C., om Temperaturer, som ere noget vanskeligere at opnaa end 25° C., idet de ligge saa nær ved den Temperatur, vi i Almindelighed have i vore Arbejdsrum; Thermostater til disse Forsøg maa derfor anbringes paa et koldere Sted f. Ex. i en Kjælder, hvis de ikke kunne sættes i Forbindelse med en Iskasse; vi henvise i saa Henseende til Panums Thermostat, der er omtalt og afbildet i I Bd. 1 Hefte p. 48 o. fl.

Til vore Askosporekulturer anvendte vi ved disse Undersøgelser Kulturskaale, der vare dækkede af et meget løst sluttende Laag og ikke som tidligere af en Glasplade. Det gjælder ved disse Kulturer paa Gibs for at fremkalde Askosporedannelsen om at skaffe Gjæren en saa rigelig Adgang til Luft som muligt; anvender man derfor Glasskaale med tæt sluttende Laag — og dette er forsøgt her i Laboratoriet, idet man brugte Skaale, som til en vis Grad vare omdannede til tohalsede Pasteurske Kolber, saa at al Infektion holdtes ude —, kan det godt hænde sig, at Askosporedannelsen aldeles hæmmes, eller at i alle Tilfælde kun et yderst ringe Procentantal af Cellerne udvikle disse Dannelser. Dækkes Skaalen derimod af en Glasplade, som ikke slutter tæt (Skaalens Rand maa ikke være tilsleben), er der rigelig Lufttilførsel, men Udviklingen af Bakterier finder rigtignok ogsaa især ved de højere Temperaturer Sted i en ikke ringe Grad, hvad der dog ikke synes

at have nogen væsentlig Indflydelse paa de større eller mindre Mængder af askosporedannede Celler. Denne Glasplade maa imidlertid, for ikke at stødes af, lakkes fast til Skaalen, og man er da nødt til, hver Gang der skal tages Prøver, og Glaspladen altsaa skal løftes af, at skulle tage Kulturerne ud af Thermostaten i nogen Tid for atter at lakke Glaspladen fast til Skaalen, under hvilken Operation disse ere udsatte for en Afkøling eller Opvarmning, som kan faa Indflydelse paa Askosporedannelsen. Vi have derfor forsøgt de ovenfor omtalte Skaale med løst sluttende Laag, og efterat det havde vist sig, at Askosporedannelsen ved forskjellige Temperaturer indtraf lige saa let ɔ: lige saa tidligt og lige saa hyppigt som ved de gamle Skaale med Glasplade, ere de blevne indførte til Brug her i Laboratoriet i Stedet for de tidligere anvendte (se Fig.).



Vi meddele her Kulturskaalens, Laagets og Gibsblokkens Størrelsesforhold. Skaalens Højde er 5 Ctm., dens Bund 7,1 Ctm., og dens øverste Diameter 8 Ct., alt udvendigt Maal. Laagets Højde er 2 Ctm. udv. Maal, dets indvendige Diameter 9 Ctm. Gibsblokkens Højde er 3 Ctm., dens nederste Flade 5,3 Ctm., og dens øverste Flade 3,8 Ctm. i Diameter.

Maalene angives kun som et Exempel; man har selvfølgelig stor Frihed i den Retning.

Disse Skaale ere lettere at behandle end den gamle Model ved Sterilisationen. Denne kan foregaa enten med en almindelig Bunsensk Gaslampe, ved Hjælp af hvilken Skaalen, Laaget og Gibsblokken flammerenses, eller ved 1 Times Ophedning i en almindelig Varmekasse ved c. 115° C., efterat Gibsblokken er anbragt i Skaalen, Laaget sat paa, og det hele indpakket i 2 Lag Filtrerpapir. Det er her aldeles nødvendigt nøje at paase, at Temperaturen i Kassen ikke stiger for højt, saaledes at Gibsen taber for meget af sit Krystallisationsvand, i saa Tilfælde smuldre nemlig Blokkene hen ved Tilsætningen af den Mængde Vand, som er nødvendig til Forsøgene. Man maa derfor nøjagtig kjende Temperaturen inde i Kassen, som ofte navnlig tæt ved Bunden er ikke saa lidt højere (vi have endog fundet en Forskjel af indtil 30° C.) end den Temperatur, som Thermometret, der gjennem Kassens Loft er sænket ned i dennes Indre, angiver. Den angivne Temperatur c. 115° C. gjælder derfor selvfølgelig om Kassens Indre, altsaa den Varmegrad, for hvis Paavirkning Blokkene virkelig blive

udsatte. Er Temperaturen ved Bunden af Kassen væsentlig højere, kan man ved at indskyde 1 à 2 Mellembunde af Asbest, som ere forsynede med Huller og adskilte fra hinanden ved smaa Træstykker eller desl., tildels hæve denne Ulempe.

Hvad Forfærdigelsen af Gibsblokkene angaar, bemærkes følgende. Saafremt disse støbes af en Gibser, maa man gjøre opmærksom paa, at Formen forinden Støbningen ikke overstryges med Olie eller Fedt. Det har nemlig vist sig her paa Laboratoriet, at den fedtede Overflade, som Blokkene derved faa, virker hæmmende paa Sporedannelsen; maaske kan ogsaa Alun, som stundom blandes i Gibspulveret, virke skadeligt; derover haves dog ingen Erfaring. Man kan imidlertid meget let selv støbe Gibsblokkene. Man bruger dertil en Blikform og udrører 2 Maal Gibspulver i $^3/_4$ Maal Vand.

Med Hensyn til Gibsblokkenes Tørhed eller Fugtighed, idet Gjæren udsaas, er der paa Laboratoriet gjort Forsøg, som vise, at dette Forhold ikke har nogen Betydning. Med Sacch. ellipsoideus II foretoges saaledes Udsæd, dels paa tørre, stærkt sugende Gibsblokke, dels paa Blokke, som forinden Udsæden vare blevne gjorte fugtige, og Resultatet blev i begge Tilfælde det samme. Andre Forsøg viste ogsaa hen til, at Blokkens Beskaffenhed i den Retning ingen Forskjel gjorde, dog tør man naturligvis ikke ligefrem sprøjte Vand ovenpaa Gjæren.

Det har altsaa ved vore Forsøg vist sig, at de hidtil undersøgte 20 Kulturarter med Hensyn til deres Analyse efter Hansens Methode lade sig dele i 2 Hovedgrupper, hvoraf den ene bedst analyseres ved 25° C. efter 40 Timer, den anden derimod ved 15° C. efter 72 Timer, og at man i begge Tilfælde er i Stand til at paavise en saa ringe Indblanding som 1 % og $^1/_2$ % vild Gjær. Hvad den førstnævnte Gruppes Arter angaar bemærkes, at ogsaa nogle af disse, men ikke alle, kunne analyseres ved 15° C.

Som det erindres, blev Methoden kun prøvet med Hensyn til de tre Sygdomsformer: Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III og Sacch. ellipsoideus II, men betragte vi de af Hansen udfundne Kurver for Endosporernes Udviklingsgang ogsaa hos de to andre af ham studerede vilde Gjærarter, Sacch. Pastorianus II og Sacch. ellipsoideus I, finde vi, at disse ligeledes gaa ind under ovenstaaende Hovedregel.

Methoden har følgelig ogsaa i denne Retning en udstrakt Anvendelighed.

December 1887.

Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi.

Af

Emil Chr. Hansen.

VII.

Om Alkoholgjærsvampenes Forhold til Sukkerarterne.

(Første Afhandling.)

---

1. Indledning.

Ved det 12te skandinaviske Naturforskermøde, som for omtrent 8 Aar siden blev holdt i Stockholm, meddelte jeg nogle Bidrag til Alkoholgjærsvampenes Naturhistorie og kom derved ogsaa til at berøre de Experimenter, som jeg havde begyndt at anstille med Hensyn til disse Svampes Forhold til Sukkerarterne. I de forløbne Aar har jeg fortsat disse Undersøgelser og herved erholdt Resultater, som paa flere Maader udvide vor Kundskab om disse interessante Væseners Fysiologi. Et Omrids af mine Studier gav jeg i Juli 1886 ved det 13de skandinaviske Naturforskermøde i Christiania, og en Del af de der meddelte Kjendsgjerninger ere optagne i Alfred Jørgensens Bog, »Die Mikroorganismen der Gährungsindustrie«, Berlin 1886; i en Række Afhandlinger agter jeg nu efterhaanden at give en sammenfattende og udførlig Fremstilling af det samme Emne, behandlet fra forskjellige Synspunkter. De paa dette Sted beskrevne Forsøg bleve anstillede med de fire Sukkerarter, Saccharose, Maltose, Lactose og Dextrose, og med henved 40 Svampearter, nemlig: de sex Saccharomyces, som jeg i 1883 har indført i Literaturen, endvidere med Sacch. Marxianus, Sacch. exiguus, Sacch. membranæfaciens, 10 Arter af Bryggeri-

undergjær (Sacch. cerevisiæ), Mycoderma cerevisiæ, Sacch. apiculatus, 7 Arter af Pasteurs saakaldte Torula, Monilia candida, Mucor erectus, Mucor spinosus, Mucor Mucedo, Mucor racemosus og nogle ikke nærmere beskrevne Arter af sidstnævnte Slægt samt Oidium lactis. Det er saaledes den mest omfattende Undersøgelse, der hidtil paa dette Omraade er bleven udført. At der dog i Naturen findes endnu flere fysiologiske Kombinationer end dem, jeg har iagttaget, derom er jeg forvisset, men jeg har tillige Grund til at antage, at mine Studier have været tilstrækkelig udførlige til at give os en i det Hele overskuelig Forestilling om den Mangfoldighed, der ogsaa i den Retning findes.

Hvad vi hidtil have vidst herom er temmelig lidet, navnlig var Arternes Forhold til Maltosen i de allerfleste Tilfælde ukjendt. Stilles Spørgsmaalet fra Gjæringsindustriens Standpunkt, har denne Sukkerart imidlertid netop særlig Interesse, men ogsaa theoretiske Problemer knytte sig dertil.

Af praktiske Grunde bleve Bakterierne ikke tagne med, skjøndt der blandt dem ligeledes findes flere, som kunne fremkalde Alkoholgjæring.

Om nogle af Arterne har jeg i mine tidligere Afhandlinger givet andre Oplysninger (se dette Tidsskrifts I B. 2 Hefte 1879; 3 Hefte 1881; 4 Hefte 1882; II B. 2 Hefte 1883; 4 Hefte 1886); en Del behandles derimod her for første Gang.

For Sammenhængens og Oversigtens Skyld maatte der tages enkelte med, som vel morfologisk stemme overens med visse Alkoholgjærsvampe, men som dog ikke fremkalde Gjæring.

Sukkerarterne bleve dels anvendte i vandige Opløsninger uden nogen Tilsætning, og naar intet Andet bemærkes, var dette bestandig Tilfældet, dels med en Tilsætning af det af Pasteur og Andre saa hyppig benyttede Gjærvandsafkog. Den anvendte Ølurt var almindelig humlet Urt (14—15 % Ball.), som den bruges i Undergjæringsbryggerier til Lagerøl. Alle Vædsker vare selvfølgelig steriliserede, og der blev bestandig arbejdet med absolute Renkulturer. Disse bleve for Gjærcellernes Vedkommende fremstillede efter den i mine tidligere Afhandlinger beskrevne Methode. Hos Mucor-Arterne tog jeg mit Udgangspunkt fra et eneste Sporangium, altsaa ogsaa fra Individet. At dette i Virkeligheden er den eneste sikre Vej, har jeg i Aarenes Løb havt rig Lejlighed til at erfare.

Figurerne ere tegnede dels af Hr. Assistent Holm, dels af mig selv. Forstørrelsen er i alle Tilfælde 1000 Gange linear.

Ifølge sin Natur maa dette Arbejde komme til at omfatte et stort Antal ensartede Analyser og blive rigt paa Enkeltheder; thi kun ad den Vej kan en Sammenligning finde Sted, og et Overblik over den store Mangfoldighed vindes. I hver Afdeling har jeg sat Analyserne, hvorpaa det Hele bygges, i Spidsen og derefter fremhævet de almindelige Resultater, der kunne uddrages deraf. Endelig findes i Afhandlingens sidste Afsnit et Tilbageblik paa det Hele.

2. Saccharomyces.

De sex Arter, hvormed jeg i de senere Aar navnlig har experimenteret, nemlig Sacch. cerevisiæ I, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus II, Sacch. Pastorianus III, Sacch. ellipsoideus I og Sacch. ellipsoideus II udvikle alle Invertin; de omdanne herved Saccharose til Invertsukker og forgjære dette. At de ogsaa forgjære Dextrose, behøver næppe at fremhæves. I Maltoseopløsninger fremkalde de ligeledes en kraftig Gjæring, navnlig naar man tilsætter lidt Næringsvædske, som f. Ex. det omtalte Gjærvandsextrakt. De ere alle kraftige Gjærsvampe, som i Ølurt ved almindelig Stuevarme i Løbet af 14 Døgn med Lethed give 4—6 Vol. % Alkohol. I Lactose formaa de derimod ligesaa lidt som nogen af de talrige hidtil undersøgte Alkoholgjærsvampe at fremkalde nogen Gjæring. Til sidstnævnte Resultat kom ogsaa andre Forskere, f. Ex. Pasteur, Fitz, Duclaux[1]). Hvad ovenfor er meddelt gjælder ogsaa om alle de i Industrien anvendte Undergjærformer, som ere blevne undersøgte.

Paa en helt anden Maade stille derimod Sacch. Marxianus, Sacch. exiguus og Sacch. membranæfaciens sig.

Sacch. Marxianus nov. spec.

Med dette Navn betegner jeg en Art, som, naar den dyrkes i Ølurt efter den Fremgangsmaade, jeg i mine tidligere Afhandlinger har angivet, udvikler smaa ovale og ægformede Celler,

---

[1]) I den nyeste Tid er der dog kommen en Meddelelse fra Duclaux (Annales de l'institut Pasteur. 1887. Nr. 12) om, at han i Mælk har opdaget en Gjærsvamp, som formaar at fremkalde Alkoholgjæring i en Lactoseopløsning. En Omdannelse af Lactose til Galactose blev ikke iagttagen. Om denne interessante Art har endogen Sporedannelse eller ej, blev ikke afgjort; han kalder den desuagtet for en Saccharomyces. Meget i hans Beskrivelse tyder imidlertid hen paa, at den nærmest hører til den Gruppe, som i det Følgende omhandles under Navnet Torula.

væsentlig af samme Udseende som Sacch. exiguus og Sacch. ellipsoideus. Imellem disse optræder der imidlertid hurtigt tillige langstrakt pølsedannede, ofte i Kolonier, og lader man Urt-Kulturen henstaa en Tid, danner der sig smaa skimmellignende Legemer, som dels svømme om i Vædsken, dels lejre sig i Bundfaldet. De bestaa af sammenfiltrede, mycelieagtige Kolonier, væsentlig af samme Beskaffenhed som de Hindedannelser, jeg har beskrevet og afbildet hos mine sex foran nævnte Saccharomyceter[1]), de ere ogsaa ligesom disse opbyggede af Led, som ved Forbindelsesstederne ere indsnevrede og let skilles ad. Vi have altsaa her en Art, som vi efter Reess ligesaa godt kunne henføre til Gruppen Sacch. Pastorianus som til Sacch. exiguus eller Sacch. ellipsoideus. Den hører til de Saccharomyceter, som ikke ere særlig villige til at udvikle Endosporer. Disse udmærke sig derved, at de hyppig ere mere eller mindre nyreformede; som sædvanlig findes dog tillige runde og ovale Former. Ogsaa hos Sporerne af andre Saccharomyceter har jeg iagttaget lignende Uregelmæssigheder, men hos denne ere de særlig fremtrædende. Efter 2—3 Maaneders Henstand fandtes i Urtkulturerne i de tohalsede Kolber kun Antydning af Hinde og heri kun faa Celler, dels kort pølsedannede, dels ovale.

Det er en af de Arter, med hvilke det under visse Kulturbetingelser paa fast Næringssubstrat er lykkedes for mig at bringe Saccharomyces-Cellen til at udvikle et Mycelium, lig det, der saa hyppig optræder hos flere Skimmelsvampe med Gjærcelle-Konidier, f. Ex. hos min Monilia candida.

I Ølurt gav den, endog efter lang Henstand, kun 1—1,3 Vol. $^0/_0$ Alkohol. I Overensstemmelse hermed fremkaldte den ikke nogen Gjæring i Maltose. Saccharoseopløsninger bleve inverterede, og i en saadan, bestaaende af c. 15 $^0/_0$ Saccharose i Gjærvand, dannede den efter 18 Døgn ved c. 25° C. 3,75 Vol. $^0/_0$ Alkohol, og efter 38 Døgn 7 Vol. $^0/_0$.

I to Gjærvandsopløsninger, hvoraf den ene indeholdt 10 og den anden 15 $^0/_0$ Dextrose, gav den under lignende Omstændigheder efter 14 Døgns Forløb i det første Tilfælde 5,1 og i det sidste 5,6 Vol. $^0/_0$ Alkohol. Efter 1 Maaneds Henstand fandtes i førstnævnte Kolbe 6,5 og i sidstnævnte c. 8 Vol. $^0/_0$ Alkohol.

Denne interessante Saccharomycet har jeg opkaldt efter den fortjente Zymotekniker Louis Marx i Marseille, som først har opdaget den, nemlig paa Vindruer.

---

[1]) Emil Chr. Hansen, Om Hindedannelsen hos Slægten Saccharomyces. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, II B. 4 Hefte. 1886. Tavle III—VIII.)

Sacch. exiguus.

Dette Navn har jeg knyttet til en Saccharomycet, der under de foran berørte Kulturbetingelser udvikler en Vegetation, som stemmer ret godt overens med de Celleformer, som Reess betegner saaledes; jeg foreslaar derfor, at det herefter anvendes for den af mig her behandlede Art. Om Reess netop har tænkt paa denne, er naturligvis ikke til at afgjøre. Saadanne smaa Gjærceller som de, der af ham og hans Efterfølgere bleve kaldte Sacch. exiguus, kunne udvikles af enhver Saccharomyces-Art, og under visse Betingelser i et stort Overtal.

Den er vistnok kun lidet villigere end den nærmest foregaaende til at udvikle Endosporer. Ejheller Hindedannelsen foregaar med nogen Kraft; endog efter flere Maaneders Henstand dannede den i Urt-Kulturer i Pasteurske Kolber kun Antydninger deraf, men derimod en ret vel udviklet Gjærringdannelse. Hindens Celler ligne i det Hele Bundgjærens, dog ere kort pølsedannede og smaa Former heri vistnok hyppigere. Jeg fandt den for nogle Aar siden temmelig almindelig i Gjær fra en Pressegjærfabrik. Fra Sacch. Marxianus adskiller den sig fornemmelig derved, at den i Urt-Kulturer ikke udvikler de mycelielignende Kolonier og paa fast Næringssubstrat intet Mycel.

I sit Forhold til Sukkerarterne ligner den derimod denne, hvilket allerede blev fremhævet i min foran citerede Afhandling fra 1886. Under de angivne Forsøgsbetingelser udfoldede den dog saavel i Saccharose- som i Dextroseopløsningerne en kraftigere Gjærvirksomhed.

I Urt-Kulturer gav den ligesom foregaaende Art kun 1—1,3 Vol. % Alkohol, og efter flere Maaneders Henstand var denne Alkoholmængde ikke forøget.

I Maltoseopløsning fremkaldte den ingen Gjæring; den inverterede en Saccharoseopløsning, og i Opløsninger af saavel 10 som 15 % Rørsukker i Gjærvand gav den efter 14 Døgns Kultur ved 25° C. 5,6 Vol. % Alkohol. I den førstnævnte Vædske var det da ej muligt at paavise Spor af Sukker, i den sidste var der endnu en Rest tilbage. Efter 26 Døgns Henstand fandtes i Kolben med den stærke Sukkeropløsning 6 Vol. % Alkohol, men bestandig kunde en Rest Invertsukker paavises. I et lignende Forsøg med sidstnævnte Vædske henstod Kolben 5 Uger; der fandtes da 5,7 Vol. % Alkohol. Maximum for denne Dannelse synes altsaa under de givne Forhold at ligge i Nærheden af 6 %.

I to Opløsninger, bestaaende af 10 og 15 % Dextrose i Gjærvand, gav den under lignende Omstændigheder efter 14 Døgns

Henstand henholdsvis 6,4 og 8 Vol. % Alkohol, og efter en Maaneds Henstand fandtes i begge Tilfælde endnu den samme Alkoholmængde.

Af Saccharomyces-Arter, der ligesom Sacch. exiguus og Sacch. Marxianus vel kunne forgjære Saccharose og Dextrose, men derimod hverken Maltose eller Lactose, har jeg iagttaget flere. Hidtil manglede jeg dog bestandig Tid til at underkaste dem et nøjere Studium.

Vi komme derefter til en ny Art:

Sacch. membranæfaciens nov. spec.

I Urt dannede den hurtigt paa hele Vædskens Overflade en stærkt udviklet, lysegraa, foldet Hinde, bestaaende af hovedsagelig pølsedannede og langstrakt ovale Celler, rige paa Vakuoler og i Almindelighed med Udseende, som om de vare mere eller mindre udtømte. De optræde dels i Kolonier, dels enkeltvis, og imellem dem findes rigelig Luftindblanding. Sacch. membranæfaciens udmærker sig blandt andet ved den Yppighed, hvormed dens Endosporer dannes, disse udvikles nemlig ikke blot i stort Antal under de for de foregaaende Arter angivne Dyrkningsforhold[1]), men tillige almindelig i Hinderne.

De ere ofte rundladne, men dog i Reglen af uregelmæssig Form. I Ranvier's Kammer med Ølurt som Næringsvædske iagttog jeg deres Spiring efter 10—19 Timers Henstand ved almindelig Stuevarme; sprængte Modercellevægge vare da hyppige; kun Knopskydning fandt Sted, men ingensinde Myceliedannelse. I Spredekulturer i Næringsgelatine, bestaaende af Ølurt med 5—6% Gelatine, dannede den matte, graa Pletter, ofte med en svag rødlig Tone; de vare i Reglen fladt udbredte, rundagtige og rynkede. Denne Beskrivelse gjælder imidlertid kun de Vegetationer, som vare fuldstændig brudte igjennem; de endnu af Gelatinen indesluttede Pletter havde nemlig et helt andet Udseende, og i de Tilfælde, hvor den dækkende Gelatinehinde var saa tynd, at man kun med megen Møje kunde iagttage den, gjorde de Indtryk af at tilhøre en hel anden Art, et nyt Exempel paa, hvilke Fejltagelser man ad den Vej kan blive udsat for. De beskrevne frembrudte Vegetationspletter kunne med Lethed skjelnes fra de Pletter, som under lignende Forhold dannes af alle de andre hidtil undersøgte

---

[1]) Emil Chr. Hansen, Om Askosporedannelsen hos Slægten Saccharomyces. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, II B. 2 Hefte 1883, p. 65).

Saccharomyceter; derimod have de stor Lighed med dem, der dannes af Mycoderma vini og Mycod. cerevisiæ[1]).

Hverken i Ølurt eller i Opløsninger af Saccharose, Dextrose, Maltose eller Lactose fremkaldte den Alkoholgjæring, og den formaaede ejheller at invertere Saccharosen.

Dens Vegetationer paa Næringsgelatine udmærkede sig ved den forholdsvis store Lethed, med hvilken de bevirkede, at denne blev flydende. Saavel ved sin stærkt udprægede Hindedannelse som navnlig ved de netop fremhævede fysiologiske Ejendommeligheder indtager den en særegen Plads iblandt de øvrige ægte Saccharomyceter.

Jeg fandt den i en gelatinøs Masse, der havde udviklet sig paa beskadigede Rødder af Ælmetræer, der vare angrebne af forskjellige Svampe. Disse Træer staa paa en aaben Plads tæt ved min Bolig paa Gl. Carlsberg. I flere Henseender har denne nye Art Lighed med de i Literaturen saa hyppig omtalte Mycoderma vini og Mycod. cerevisiæ eller Sacch. Mycoderma, som de ogsaa, men med Urette, ere blevne kaldte. Den adskiller sig dog fra disse foruden ved flere Smaaforskjelligheder især derved, at den, som anført, er en ægte Saccharomycet med meget udpræget Endospore-Udvikling, hvilken derimod aldeles mangler hos hine. De sporelignende Legemer, der af Reess og Engel omtales hos den saakaldte Sacch. Mycoderma (Mycoderma vini og Mycod. cerevisiæ), maa, som jeg i en tidligere Afhandling allerede har fremhævet, nærmest opfattes som fedtagtige Legemer. Brefeld og flere andre Forskere søgte ligesom jeg selv bestandig forgjæves efter virkelige Sporer hos dem. De hos J. de Seynes og Cienkowski beskrevne Sporer have maaske samme Betydning, muligvis hidrøre de ogsaa fra forskjellige Arter af ægte Saccharomyceter, som tilfældigvis fandtes indblandede i det urene Materiale, hvormed disse Forskeres Forsøg bleve anstillede. Herved bliver det da ogsaa forklarligt, at Cienkowski kunde udtale den Anskuelse, at Sacch. apiculatus, Sacch. Pastorianus o. s. v. kun ere Udviklingsformer af Mycoderma vini.

Medens de nævnte Mycoderma-Arter høre til de hyppigst forekommende Svampe og derfor utallige Gange ere blevne undersøgte, maa Sacch. membranæfaciens derimod antages at være en sjelden Art; jeg har i hvert Fald uagtet mange Aars flittig Søgen

[1]) Emil Chr. Hansen, Methoder til Fremstilling af Renkulturer af Saccharomyceter og lignende Mikroorganismer. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, II B. 4 Hefte 1886, p. 162).

kun een eneste Gang fundet den. Under Forhold, hvor Mycod. cerevisiæ og Mycod. vini (om disse Arter se p. 229) hurtig give en spontan Vegetation, optraadte den aldrig.

Vi have altsaa her Gjærceller, som vel høre til en aldeles typisk Saccharomyces-Art, men som dog i fysiologisk Henseende ikke kunne henregnes til Alkoholgjærsvampene. Noget Lignende er fornylig blevet paastaaet om en anden Art, der optræder med smaa (1,5—3 Mikromillim.) brunladne Celler, hvilke formere sig ved Knopskydning. I Næringsvædsker med Mælkesukker, Drue- eller Rørsukker udvikler den sig langsomt og danner et mørkt Bundfald, men uden at fremkalde Alkoholgjæring, og det angives, at den paa Mælkeserum skulde kunne udvikle Endosporer (Marpmann, Archiv der Pharmacie Aug. 1886). Da Forfatteren var saa venlig at sende mig en levende Kultur af disse Celler, blev der dermed anstillet nogle Undersøgelser her paa vort Laboratorium. Hovedresultatet blev, at de ikke tilhøre en Saccharomyces-, men en Cladosporium- eller en Fumago-Art. Ved passende Dyrkning optraadte der vel smaa Legemer i Cellerne, som have Lighed med Endosporer, men de spire ikke og have ejheller Sporens Bygning, og ved Tilsætning af Vinaand opløses de.

Indtil videre er altsaa Sacch. membranæfaciens den eneste bekjendte Saccharomycet, som ikke giver Alkoholgjæring, og den eneste, som mangler Invertin; alle de øvrige fremkalde, som det foran blev vist, kraftig Alkoholgjæring i Saccharose- og i Dextrose- og nogle tillige i Maltoseopløsninger, andre derimod ikke i sidstnævnte.

Resultater.

Ved disse Studier er vor tidligere Opfattelse af Slægten Saccharomyces i kjendelig Grad bleven forandret; i fysiologisk Henseende har det saaledes vist sig, at dens Arter ikke længere uden videre kunne karakteriseres som værende Alkoholgjærsvampe, og i morfologisk Henseende blev der gjort den vigtige Iagttagelse, at idetmindste nogle kunne udvikle et Mycelium. Ogsaa for Species-Erkjendelsen gave mine Undersøgelser nye og bestemte Holdepunkter, idet vi saa, hvilke skarpe Differenser, der i flere Tilfælde træde frem i Cellernes Forhold til Sukkerarterne.[1])

[1]) Hovedvægten i nærværende Afhandling blev, som det erindres fra Indledningen, lagt derpaa at bestemme, om de Arter, hvormed jeg experimenterede, kunde forgjære de nævnte fire Sukkerarter eller ej.

Alle de iagttagne Saccharomyceter med Undtagelse af een Art (Sacch. membranæfaciens) vare altsaa typiske Alkoholgjærsvampe med Invertinudsondring; de forgjærede saavel Saccharose som Dextrose, sidstnævnte med større Kraft end førstnævnte, de fleste tillige Maltose. Heri have vi en Forklaring til den Kjendsgjerning, at disse Svampe spille en saa overordentlig betydningsfuld Rolle i Gjæringsindustrien. Ifølge ovenstaaende kunne de fleste nemlig ikke blot anvendes ved Fabrikationen af Drue- og andre Frugtvine, men tillige i Bryggeri- og Brænderidriften. At man i Industrien baade maa og kan foretage et Udvalg, have de foreliggende Undersøgelser paany lært os.

---

for derigjennem at erholde et Overblik over de Kombinationer, som i den Retning gjøre sig gjældende. De andre Spørgsmaal, der hertil sluttede sig, maatte følgelig træde mere i Baggrunden, f. Ex. Undersøgelsen over den Gjæringsenergi, Arterne vise med Hensyn til Frembringelsen af Alkohol. At der dog ogsaa i den Retning iagttoges tydelige Differenser, ses ved at sammenligne de tilsvarende Forsøgsrækker, som bleve anstillede med Sacch. Marxianus og Sacch. exiguus, og endnu tydeligere i de følgende Kapitler. Hvis mit Arbejde imidlertid paa dette Omraade skulde have været fuldstændigt, maatte jeg have anstillet komparative Forsøg med alle Arterne i en og samme Næringsvædske; men dette kunde ikke forenes med Hovedopgaven. Saadanne Undersøgelser ere tilmed i den nyeste Tid blevne udførte af Borgmann (Zur chemischen Charakteristik durch Reinculturen erzeugter Biere. Fresenius, Zeitschr. f. analyt. Chemie. XXV. Heft IV, p. 532) og Amthor (Studien über reine Hefen. Zeitschr. f. physiolog. Chemie XII, p. 64). Enhver af disse Forskere anvendte i alle Forsøgsrækker Ølurt og bestandig den selv samme. Borgmanns Gjæringer bleve anstillede under Bryggeriforhold, nemlig paa Gl. Carlsberg, Amthors i Kolber i hans Laboratorium. Hovedresultatet var i begge Tilfælde det samme, nemlig at de forskjellige Saccharomyces-Arter ogsaa under de nævnte Forhold udføre et forskjelligt kemisk Arbejde. Særlig interessant vare de Differenser, som traadte frem med Hensyn til Dannelsen af Glycerin. Ogsaa de prøvede Bryggeri-Undergjærarter viste sig i de nævnte Retninger at være tydeligt forskjellige. At Saccharomyceterne under Bryggeriforhold udøve et forskjelligt kemisk Arbejde, eftersom de høre til den ene eller den anden Art, fremgik forøvrigt allerede af mine Undersøgelser over de af dem i Øl fremkaldte Sygdomme (Meddel. fra Carlsberg Laboratoriet, II B. 2 H., 1883, p. 93 og Zeitschr f. das ges. Brauwesen, München 1884, p. 273). Rigtigheden af den i sidstnævnte Afhandling opstillede Lære blev bekræftet af Grønlund i en udførlig experimentel Undersøgelse: »Ueber bitteren unangenehmen Beigeschmack des Bieres« (Zeitschr. f. das ges. Brauwesen, München 1887, p. 469).

De nye Arter ville senere blive nøjere behandlede af mig i en Afhandling om Slægten Saccharomyces Systematik; i denne agter jeg da ogsaa at give de fornødne Afbildninger. Jeg griber her Lejligheden til at meddele et Par oplysende Bemærkninger i Anledning af de Bebrejdelser, der ere blevne rettede imod mig, fordi jeg vedbliver at benytte Reess's systematiske Navne, uagtet jeg jo selv har vist, at der ikke knytter sig nogen bestemt Forestilling dertil, og at overhovedet de Principer, hvorefter Reess byggede sit System, ere uholdbare. Aarsagen hertil er, at jeg ikke ønsker at forøge Registeret med nye Navne, forend det er strængt nødvendigt. Det systematiske Navn bør jo ogsaa efter sit Væsen egentlig ligesom danne Slutstenen for hele Undersøgelsen; men at naa hertil er vanskeligt og tager Tid.

3. Alkoholgjærsvampe med saccharomyceslignende Celler.

Hertil henregner jeg foruden de i Literaturen meget omtalte Mycoderma vini, Mycod. cerevisiæ og Sacch. apiculatus endvidere Gjærceller, hvis svagt gjærende Former nærmest synes at stemme overens med dem, der i Pasteurs Études sur la bière kaldes Torula — for at have en foreløbig Betegnelse for dem har jeg i hvert Fald benyttet dette Navn —, og endelig en Art, der slutter sig til sidstnævnte, nemlig Monilia candida. Det er alle Svampe, som i gjæringsdygtige Vædsker danne Vegetationer, der have stor Lighed med Saccharomyceter og ofte ere blevne sammenblandede dermed, men som skarpt adskille sig fra disse derved, at de mangle Endosporedannelsen. Nogle kunne udvikle et Mycelium og en mere eller mindre fremtrædende Skimmelvegetation, andre derimod ikke.

Mycoderma cerevisiæ.

Det blev foran fremhævet, at denne Arts Celler ere meget udbredte. Saasnart Øl, Vin eller lignende Vædsker udsættes for Luftens direkte Paavirkning, blive de hurtigt bedækkede med en Hinde deraf; dette gjælder endog om Øllet i Bryggeriernes kolde Lagerkjældere. Som bekjendt, har den ogsaa netop erholdt Navnene Mycod. vini og Mycod. cerevisiæ efter den Maade, hvorpaa den optræder. Alkoholgjæring fremkalder den ikke i nogen af de foran nævnte Sukkerarter og ejheller Inversion i Saccharoseopløsninger. Dens fysiologiske Virksomhed fortjener iøvrigt et nøjere Studium, ogsaa er det muligt, at der under de angivne Navne skjules ikke eet, men flere Species.

Sacch. apiculatus

har faaet sit Artsnavn paa Grund af sine smaa citronformede Gjærceller; Slægtnavnet bærer den, som ovenfor berørt, med Urette; den er imidlertid under det her angivne Navn vel kjendt i Literaturen og skal derfor ogsaa beholde det, indtil en Gang et nyt System paa dette Omraade med nogen Sikkerhed kan opbygges. I mine tidligere Afhandlinger[1]) paaviste jeg, at denne Art i Ølurt fremkalder en temmelig svag Alkoholdannelse, nemlig kun c. 1 Vol. %. De Forsøg, jeg den Gang anstillede med Hensyn til Spørgsmaalet, hvorvidt den kan forgjære en Del af Maltosen eller ej, viste nærmest hen til, at der ikke finder en saadan Forgjæring Sted. Ved senere at gjenoptage disse Arbejder, har jeg fundet Bekræftelse paa, at Sagen netop forholder sig saaledes.

Som det erindres fra mine ovenfor nævnte Undersøgelser, formaar den ikke at invertere Saccharose og kan ikke forgjære denne Sukkerart. Naar jeg i Overensstemmelse med den da gjældende kemiske og fysiologiske Anskuelse om Saccharosen heri fandt et nyt Bevis for, at denne Sukkerart ikke er direkte gjæringsdygtig, saa maa det nu siges, at denne Maade at slutte paa ikke er berettiget. Det blev nemlig mig selv forbeholdt nogle Aar efter at opdage en Gjærsvamp, som stiller sig imod den hidtil gjældende fysiologiske Regel paa dette Omraade. (Se Monilia candida p. 240.)

I Opløsninger af 15 og 10 % Dextrose i Gjærvand fremkalder Sacch. apiculatus en temmelig kraftig Gjæring. Efter 15 Døgns Henstand ved c. 25° C. dannede den under disse Forhold henholdsvis 2,8 og 2,6 Vol. % Alkohol, og efter 1½ Maaned lidt over 3 Vol. %, højere steg Alkoholmængden ikke; efter 3 Maaneders Forløb fandtes den nemlig bestandig at være den samme. Ved Forsøgets Slutning gave Vædskerne tydelig Reaktion for Sukker. Sacch. apiculatus har følgelig ikke kunnet føre Gjæringen til Ende. I et andet Forsøg med 10 % Dextrose i Gjærvand fandtes efter 15 Døgn ved 25° C. 3,7 og efter 25 Døgn 4,3 Vol. % Alkohol. Boutroux angiver, at den i Næringsvædsker, bestaaende af 6,4 og 17 % Dextrose i Gjærvand med lidt Vinsyre, gav henholdsvis 3,3 og 5,4 Vol. % Alkohol. Det er tænkeligt, at Tilsætningen af Vinsyre har fremmet Forgjæringen. I min næste Afhandling over

---

[1]) Emil Chr. Hansen, Ueber Saccharomyces apiculatus. (Hedwigia, 1880, p. 75) og navnlig: Om Saccharomyces apiculatus og dens Kredsløb i den frie Natur. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, I B. 1881. p. 313). Nye Undersøgelser over Cellernes Forhold i den frie Natur gav jeg i Botan. Centralblatt, B. XXI. 1885, Nr. 6.

Sukkerarternes Forhold under Alkoholgjæringen vil jeg muligvis komme tilbage hertil.

Om Lactosen blev det i forrige Afsnit en Gang for alle fremhævet, at iblandt de hidtil undersøgte Alkoholgjærsvampe kun en er funden, som formaar at fremkalde Gjæring deri.

Pasteurs Torula.

Vi gaa derefter over til at betragte den Gruppe af Gjærceller, som vi i Følge ovenstaaende Bemærkninger kalde Torula. I en Afhandling fra 1883 i nærværende Tidsskrift har jeg behandlet 5 Arter deraf. Tre af dem frembragte efter at have været dyrkede endog meget lang Tid i Urt og i andre Sukkeropløsninger kun usikre Spor af Alkohol uden kjendelig Kulsyreudvikling; de kunne altsaa næppe henregnes til Alkoholgjærsvampene; en af disse tre Arter udviklede Invertin, de to derimod ikke. De to øvrige Arter gave i de ovenfor beskrevne Urt-Kulturer c. 1 Vol. % Alkohol, den ene inverterede Saccharoseopløsninger, den anden ikke.

Det kan her nævnes, at Roux i Pasteurs Laboratorium i 1881 studerede en Gjærsvamp, der vist ogsaa maa henregnes hertil; den fremkaldte tydelig Alkoholgjæring i en Dextroseopløsning, men hverken i Saccharose- eller i Lactoseopløsning, og manglede Invertin. Senere have andre Forskere gjort lignende Iagttagelser; Angivelserne ere imidlertid saa usikre, at man ikke kan se, om de have arbejdet med Renkulturer eller ej, og navnlig er det umuligt at afgjøre, om de have havt de foran omtalte eller helt andre Arter for sig.

Af de Meddelelser, der i det nærmest Foregaaende bleve givne om mine 5 Torula-Arter, fremgaar, at kun to udviklede Invertin, og at næppe nogen af dem forgjærer Maltose; ved direkte Forsøg blev dog kun deres Forhold i Ølurt og i Saccharoseopløsning bestemt, og da jeg efter lang Tids Forløb atter optog disse Experimenter, fandtes de ikke længere her paa Laboratoriet; jeg opsøgte derfor nyt Materiale.

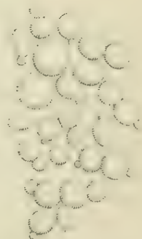


Fig. 1. Bundgjær fra 1 Døgns Kultur i Ølurt ved c. 25° C.

Den første af de to nye Arter, som jeg nedenfor skal beskrive, erholdt jeg tilfældigvis ved Infektion fra Luften. Unge, kraftige Vegetationer deraf, som ere dyrkede paa den foran ofte omtalte Maade i Ølurt, bestaa af kuglerunde og ovale, smaa Gjærceller som hosstaaende Fig 1.

Ligesom alle de øvrige, der omhandles i denne Afdeling af min Afhandling, udviklede de ikke Endosporer.

I Ølurt give de en tydelig Gjæring og indtil 1,3 Vol. $^0/_0$ Alkohol.

I Maltoseopløsninger formaa de derimod ikke at fremkalde nogen Gjæring. De invertere Saccharoseopløsning, og i 10 og 15 $^0/_0$ Opløsninger i Gjærvand dannede de efter 14 Døgns Kultur ved c. 25^0 C. henholdsvis 5,1 og 6,2 Vol. $^0/_0$ Alkohol. Kulturen med den sidste Vædske blev derpaa stillet hen ved almindelig Stuevarme, hvor den forblev 2 Maaneder; den indeholdt da 7 Vol. $^0/_0$, og alt Sukkeret var forsvundet.

Under lignende Omstændigheder dannede denne Art i Opløsninger, bestaaende af Gjærvand med 10 og 15 $^0/_0$ Dextrose, efter 15 Døgn i det førstnævnte Tilfælde 6,5 og i det sidstnævnte 8,3 Vol. $^0/_0$ Alkohol. Da de samme Kulturer havde staaet 2 Maaneder ialt ved den angivne Temperatur, indeholdt den førstnævnte 6,6 og den sidstnævnte 8,5 Vol. $^0/_0$ Alkohol. Gjæringsvirksomheden var følgelig kraftigere i Dextrose- end i de tilsvarende Saccharoseopløsninger.

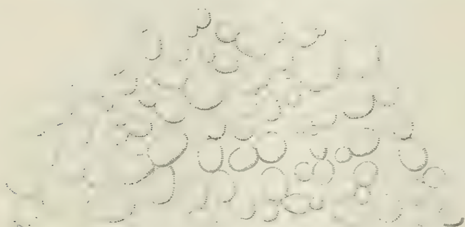


Fig. 2. Bundgjær fra 1 Døgns Kultur i Ølurt ved c. 25^0 C.

Den anden nye Art fandt jeg i Jord under Vinranker paa et Bjerg ved Rhinen i Forsommeren 1885. Ovenstaaende Fig. 2 viser os dens Celler fra lignende Kulturer som foregaaende Arts. De ere i Modsætning til dennes hyppigere ovale og mange ere betydelig større.

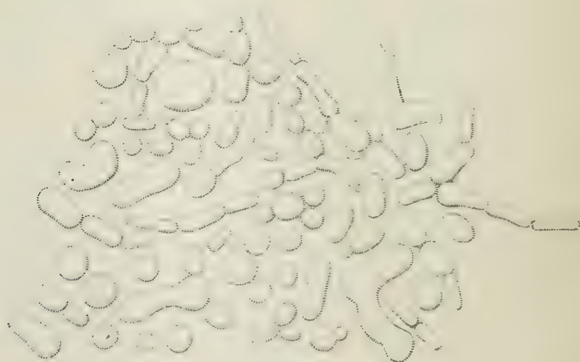


Fig. 3.

Som et Exempel paa Hindedannelsen hos Torula-Gjærceller afbildes her tillige Vegetationen fra en Hinde i en 10 Maaneders gammel Urt-Kultur af nærværende Art (Fig. 3). Det ses, at Cellerne deri, sammenlignede med Fig. 2, hyppig ere større, uregelmæssige og langstrakt pølsedannede, Kjendetegn, der ogsaa ere almindelige for lignende gamle Hindedannelser hos Saccharomyceterne.

Den her omhandlede Ikke-Saccharomycet giver i Ølurt kun 1 Vol. % Alkohol. I Maltose fremkalder den ingen Gjæring; det Samme gjælder om Saccharosen, som den ejheller formaar at invertere.

I 10 og 15 % Dextrose i Gjærvand udviklede den efter 15 Døgns Henstand ved c. 25° C. henholdsvis 4,6 og 4,5 Vol. % Alkohol. Efterat vedkommende Kulturer havde staaet 28 Døgn ialt ved den nævnte Temperatur, fandtes i den førstnævnte 4,8 og i den sidstnævnte 4,7 Vol. % Alkohol. To andre, men ellers lignende Kulturer, som stode betydeligt længere, forinden Undersogelsen fandt Sted, indeholdt tilsidst i Kolben med 10 % Dextrose 4,8 og i Kolben med 15 % Dextrose 5,3 Vol. % Alkohol; Vædsken i førstnævnte Kolbe gav da kun meget svag Reduktion af Fehlings Reagens, Vædsken i sidstnævnte derimod en stærk Reduktion. I denne var der følgelig en kjendelig Sukkerrest tilbage, men ved fortsat Henstand viste det sig, at Forgjæringen ikke gik videre.

I fysiologisk Henseende adskiller denne Art sig altsaa fra den foregaaende ikke blot derved, at den mangler Invertin, men tillige derved, at den i de beskrevne Dextroseopløsninger udfolder en svagere Gjæringsvirksomhed.

Som ovenfor anført, fandt jeg den i Jord under Vinranker. Der er saaledes megen Udsigt til, at den med Støvet i tørre Perioder kan komme op paa Druerne, og naar Mosten presses af disse, vil den da ogsaa komme til at tage Del i Vingjæringen. Det er overhovedet ikke usandsynligt, at Arter, der som denne og den nærmest foregaaende, fremkalde en kraftig Alkoholgjæring i Dextroseopløsning, ogsaa spille en vigtig Rolle i Vin- og anden Frugtgjæring. I Bryggerierne og Brænderierne kunne de derimod næppe antages at have nogen stor Indflydelse, da de, som det erindres, ikke formaa at forgjære Maltosen, den Sukkerart, der er saa fremtrædende i Ølurten og i Mæsken.

Meget almindelig udbredte i Naturen ere de Torula-Former, der mangle Invertin, og som i Olurt-Kulturer kun give c. 1 Vol. % Alkohol og i Overensstemmelse dermed slet ikke forgjære Maltose;

saavidt Undersøgelserne gaa, fremkalde disse Arter dog en mere eller mindre kraftig Gjæring i Dextroseopløsninger.

Hos de foran behandlede Svampe med saccharomyceslignende Celler har jeg kun iagttaget Mycelieudvikling hos een, nemlig hos en af de først omtalte fem Torula-Arter.

Vi skulle derefter gaa over til Undersøgelsen af en Skimmelsvamp, som jeg har betegnet med det systematiske Navn

Monilia candida.

Om denne i fysiologisk Henseende mærkværdige Art gav jeg i 1883 lejlighedsvis nogle Meddelelser i Fasbenders zymotekniske Tidsskrift og senere i Berichte der deutschen botan. Gesellschaft (1884) samt i min Afhandling om Hindedannelsen hos Slægten Saccharomyces (nærværende Tidsskrifts II B. 1886, p. 170). I Løbet af de sidste fem Aar har jeg foretaget meget omfattende Experimenter med den, og idet jeg nu, idetmindste foreløbig, afslutter disse, er det min Agt at give en samlet Fremstilling af de vundne Resultater.

Monilia candida optræder i Naturen i frisk Kogjødning og i Sprækker og Revner paa søde, saftige Frugter. Naar den dyrkes i Ølurt eller andre sukkerholdige Næringsvædsker, f. Ex. Dextrose- og Saccharoseopløsninger med Tilsætning af Gjærvand, udvikler den i kort Tid allerede ved almindelig Stuevarme en kraftig Vegetation af saccharomyceslignende Celler, som man efter det mikroskopiske Billede nærmest kunde bestemme som Reess's Sacch. ellipsoideus eller Sacch. cerevisiæ. Se Fig. 4.

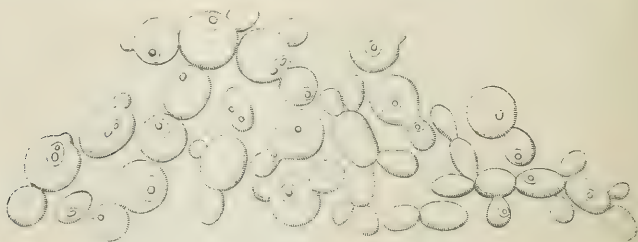


Fig. 4.

Vakuoler, hver med et eller to stærkt lysbrydende Smaalegemer, ere hyppige, og disse Smaalegemer ses i Almindelighed at være i en tumlende Bevægelse.

Den fremkalder i de nævnte Vædsker en temmelig stærk Alkoholgjæring med Overgjæringsfænomener, og medens Kulsyreudviklingen endnu er i kraftig Gang, og Skumblærer stige op, danner den

allerede paa disse en matgraa Hinde, der hurtigt strækker sig over hele Overfladen og opad Kolbens Sider, hvori Vædsken findes. I Fig. 5 ses Cellerne i en saadan ung Hindedannelse. Flere af dem have begyndt at strække sig, og mange have kun en ringe Størrelse; vi finde her ikke blot Former, der ligne Sacch. cerevisiæ og Sacch. ellipsoideus, men tillige saadanne, som have Lighed med Sacch. Pastorianus og Sacch. exiguus. De ovenfor omtalte glindsende Smaalegemer ere hverken indtegnede i denne eller i den efterfølgende Figurgruppe.



Fig. 5.

Lader man en saadan Kultur henstaa en Tidlang, saa udvikler der sig mere langstrakte Celler og tilsidst et fuldstændigt Mycelium, en hvidmelet, lidt laaden Skimmelvegetation, der afsnører Gjærcelle-Konidier eller deler sig i Led ligesom Oidium-Arterne (Fig. 6).

Ogsaa paa fast Næringssubstrat (Kartoffelskiver, Brød med og uden Næringsvædsker, Kirsebær, Ko- og Hestegjødning, Gelatine med Tilsætning af Extrakter af Æbler, Vindruer, grønne Blade af Kartoffelplanter og Kogjødning) fremkom de nævnte Vegetationer; men uagtet Dyrkningsforholdene bleve varierede i høj Grad og fortsatte aarvis, iagttoges aldrig nogen anden.

Vegetationerne ere i alle Tilfælde graaladne, oftest lyse, paa Brødet i Almindelighed gulgraa, paa Kirsebærrene rødgraa. Det blev ovenfor meddelt, at denne Art i den frie Natur findes i Kogjødning; nogen kraftig Udvikling her giver den imidlertid næppe, sikkert er det i hvert Fald, at den i Extrakter af saavel Ko- som Hestegjødning kun gav en sparsom Vegetation.

Ved at foretage Dyrkningen i Ranviers fugtige Kamre med Ølurt som Næringsvædske iagttog jeg, at Gjærcellerne under disse Dyrkningsforhold i Begyndelsen udelukkende formerede sig ved Knopskydning og først, efterat denne en Tidlang havde fundet Sted, dannede Spiretraade og Mycel; dette udviklede tilsidst saccharomyceslignende Knopper enkeltvis eller i Kolonier, som ovenstaaende Figurer vise. I Hovedtrækkene iagttog jeg den samme Udviklingsgang i mine Massekulturer i Ølurt og i Sukkeropløsning i Gjærvand, og den stemmer vistnok ogsaa overens med, hvad der overhovedet er almindeligt hos saadanne Svampe.



Fig. 6. Skimmelvegetationen af Monilia candida.

Former som *a* ere hyppige; de bestaa af Kjæder af langstrakte, mere eller mindre traadformede Celler, som indbyrdes ere temmelig løst forbundne; ved hver

I sin Skimmelvegetation slutter den sig idetmindste i flere Tilfælde temmelig nøje til Bonordens Beskrivelse og Afbildning af hans Monilia candida. Jeg valgte derfor dette systematiske Navn til min Art. Det er imidlertid her som i Almindelighed, naar Talen er om ældre Forfatteres Beskrivelser af Mikroorganismer, umuligt med Sikkerhed at afgjøre, hvilke Species dermed menes. De Former, hvormed vor Art optræder, ere tilmed kun lidet karakteristiske, og de ere fælles for talrige, ellers indbyrdes forskjellige Svampe. Det er derfor ogsaa let forstaaeligt, at man i Svampeherbarierne under dette Navn finder forskjellige Arter. Man kommer naturligvis ejheller Spørgsmaalets Løsning nærmere ved netop at søge Svampen paa det af Bonorden opgivne Voxested, raaddent Træ.

Min Meddelelse i 1884 henledte strax flere Forskeres Opmærksomhed paa denne Art, og i Løbet af kort Tid fremkom en Række Afhandlinger om dens Optræden i Naturen og dens Betydning. Det blev saaledes angivet, at den skal være almindelig i Bærme fra Brænderier, i Mask fra Bryggerier og i Hornkvægs Exkrementer (Bräutigam), i Agerjord (Adametz), i Faaregjødning og i neutral Mavesaft (List), i diarrhoeagtige Udtømmelser hos diende Børn (Eschrich), i Trøske hos Børn, unge Pattedyr og Fugle (Baginsky, Eschrich og Plaut). I sidstnævnte Forfatters fornylig udkomne Afhandling[1]) findes hele denne Literatur.

Medens Plaut i et tidligere Arbejde antog, at hans Trøskesvamp var identisk med min Monilia, er han nu kommen til det

[1]) Plaut, Neue Beiträge zur systemat. Stellung des Soorpilzes in der Botanik. Leipzig 1887.

Leddeling findes oftest en Krands af ovale Gjærceller, som let falde af. I *b* ses en anden hyppig Form, men som adskiller sig fra den førstnævnte derved, at den mangler de krandsstillede Gjærceller; i Stedet derfor udsendes i Reglen fra hver Leddeling en lignende, men kortere Gren end den, der danner Moderstammen. Leddene i disse Kjæder ere ikke sjelden indbyrdes nøje forbundne, Indsnøringerne forsvinde i mange Tilfælde, og et aldeles typisk Mycelium med tydelige Tverskillevægge opstaar da (*c*). Formerne *b* og *c* findes inde i vedkommende Næringssubstrat, *a* i Almindelighed paa Overfladen. Former som *d* ligne meget Oidium lactis. I *e* ses en Kjæde af pæreformede Celler med Krandse af Gjærceller, der have Lighed med Sacch. exiguus. Den i *f* afbildede Kjæde af citronformede Celler stemmer nøje overens med Ehrenbergs Afbildning af Oidium fructigenum (De Mycetogenesi Tab. X). Imellem de saaledes beskrevne Hovedformer findes talrige Gjærceller af forskjellig Form og i Kolonier med forskjellig Gruppering. Som sædvanlig opstaa da ogsaa Former som Sacch. conglomeratus Reess.

modsatte Resultat. Han har nemlig iagttaget, at den af mig beskrevne Art vel fremkalder en svag Mycelieudvikling i Øjets Glaslegeme, men ingen Trøskedannelse i Kroens Slimhinde hos Duer. Ogsaa i Gelatinekulturer viste den nogen Differens fra den eller de Svampe, der virkelig fremkalde den berørte Sygdom.

Det er højst sandsynligt, at de ovenfor nævnte Forfattere have arbejdet med en hel Række forskjellige Arter, og det maa da her atter fremhæves, at den morfologiske Undersøgelse ikke sætter os i Stand til at skjelne imellem dem. Den af mig behandlede er, som det Følgende viser, tydeligt karakteriseret ved sine fysiologiske Ejendommeligheder, og det er derfor ogsaa paa disse, at Hovedvægten idetmindste for Øjeblikket maa lægges.

Under Forhold, hvor Sacch. cerevisiæ (Ølundergjær) dannede 6 Vol. $^0/_0$ Alkohol, gav Monilia candida næppe $1^1/_2$; men blev Gjæringen fortsat i længere Tid, saa tog ogsaa Alkoholmængden til. Af de Forsøgsrækker, som i den Anledning bleve anstillede, meddeles nedenfor en:

Tre tohalsede Liter-Kolber (Pasteurs Model) bleve fyldte $^3/_4$ med den saa ofte omtalte steriliserede Ølurt og derpaa hver inficerede med 3 Kub-Centim. temmelig tyk flydende Gjær af unge, kraftige Celler; i den ene Kolbe anbragtes Bryggeriovergjær, i den anden Bryggeriundergjær, og i den tredie Monilia candida. Alle Kulturerne vare selvfølgelig absolut rene, og det Hele saavidt muligt indrettet saaledes, at de tre Kolber kun kom til at adskille sig fra hverandre ved den forskjellige Infektion. Forsøgene udførtes ved almindelig Stuevarme.

Efter 16 Døgn gav Kolben med	Bryggeriovergjær	6	Vol.	$^0/_0$
— — -	Bryggeriundergjær	6	-	-
— — -	Monilia candida	1,1	-	-

Efter 67 Dage indeholdt Kolberne med de to førstnævnte Gjærarter atter c. 6 Vol. $^0/_0$, Kolben med Monilia candida derimod 2 Vol. $^0/_0$. De to Bryggerigjærarter havde følgelig allerede efter 16 Døgn naaet deres Maximum; dette blev ogsaa bekræftet, da jeg efter 4 Maaneder foretog en ny Undersøgelse.

Paa dette Tidspunkt havde Monilia candida imidlertid endnu kun givet 3,4 Vol. $^0/_0$

efter	6	Maaneder	gav	den	5	Vol.	$^0/_0$
-	$9^1/_2$	—	-	-	6,5	-	-
-	26	—	-	-	6,7	-	-

Hermed var Maximum naaet, thi det viste sig, at Cellerne vare døde, da den sidste Undersøgelse blev foretagen. Øllet havde en stærkt krydret og aromatisk Lugt og reducerede endnu Fehlings Vædske; i en anden lignende Forsøgsrække var Sukkeret dog forsvundet efter lidt over 1 Aars Henstand, Vædsken indeholdt da 6,6 Vol. % Alkohol.

Ved direkte Prøve fandt jeg, at Monilia candida var levende efter at have tilbragt et Aar under de beskrevne Forhold, Bryggeriovergjæren var derimod død efter 10 Maaneders Forløb, hvorledes Bryggeriundergjæren i den nævnte Retning forholdt sig, blev ikke undersøgt.

Resultatet af de foran beskrevne og andre lignende Undersøgelser, som jeg har anstillet, er, at Monilia candida i Modsætning til, hvad der i Almindelighed finder Sted hos Saccharomyceterne, under de beskrevne Forhold kun meget langsomt naar de højere Alkoholprocenter. I denne Henseende stemmer den overens med flere Mucorineer, se p. 245.

Aarsagen til den foran omtalte langsomme Forgjæring maa tildels søges deri, at Forsøget blev anstillet ved en forholdsvis lav Temperatur; vælge vi en højere, f. Ex. 25° C, bliver i hvert Fald Resultatet et andet, Gjæringsenergien voxer da i høj Grad. Efterstaaende to Forsøgsrækker vise dette.

To Kolber, hvoraf den ene indeholdt Ølurt, og den anden en Gjærvandsopløsning med 10 % Dextrose, bleve inficerede med unge, kraftige Celler, Forsøgstemperaturen var 25° C.

Efter 7 Døgn fandtes i Urt-Kolben	2,4	Vol. %	Alkohol,
og i Kolben med Dextrose og Gjærvand	3,8	- -	—

Al Vædsken blev derpaa tømt ud, og til de betydelige Gjærbundfald, der fandtes i begge Kolber, blev der sat nye Portioner af de samme Vædsker, hvormed Gjæringerne begyndte; i dette Tilfælde indeholdt dog Gjærvandsopløsningen 15 % Dextrose.

14 Døgn derefter fandtes i Urt-Kolben	4	Vol. %	Alkohol,
og i Kolben med Dextrose og Gjærvand	5,5	- -	—

Grunden til, at Kolben med Dextrose bestandig gav en rigeligere Alkoholmængde end den anden, kan vistnok søges deri, at Dextrosen lettere forgjæres end Maltosen. Om disse to Sukkerarters indbyrdes Forhold under Gjæringen vil jeg forøvrigt i en anden Afhandling give nøjere Oplysninger.

Af ovenstaaende Forsøg følger, at denne Art maa høre til dem, der forgjære Maltose; direkte Experimenter vise ogsaa dette. I en Opløsning af c. 5 % Maltose i Gjærvand fremkaldte den

f. Ex. efter faa Døgns Henstand ved 20° C. en livlig Gjæring, og efter 42 Døgn var alt Sukkeret forsvundet, medens Vædsken nu indeholdt 2,6 Vol. % Alkohol. Et Forsøg, som blev anstillet paa den samme Maade, men med ren Maltoseopløsning i Vand, gav derimod ingen Gjæringstegn og ingen Draabereaktion; der havde følgelig ikke fundet nogen Alkoholgjæring Sted. Refraktometeret viste dog, at en lille Del af Sukkeret var forsvunden, og Vædsken reagerede surt; jeg er derfor tilbøjelig til at antage, at den forsvundne Del af Maltosen udelukkende er bleven benyttet til Cellernes Formering og Ernæring. Da der derefter blev sat lidt Gjærvand til, og vedkommende Kolbe blev stillet ind i Thermostaten ved 25° C., kom der heri temmelig stærk Gjæring, hvorved alt Sukkeret blev opbrugt. Vædsken gav nu ogsaa tydelig Reaktion for Alkohol.

Det synes altsaa, at Monilia candida vel formaar at formere sig i en ren Maltoseopløsning, men derimod ikke at fremkalde Gjæring deri, og at den først ved at erholde de nødvendige Kvælstofforbindelser og Næringssalte bliver i Stand dertil. En Forgjæring af Maltose stiller større Krav til Cellerne end en Forgjæring af Glykose, og de maa derfor, hvis de skulle kunne udføre Arbejdet, i førstnævnte Tilfælde have gunstigere Ernæringsvilkaar end i sidstnævnte. Som det erindres, blev navnlig for nogle Aar siden det Spørgsmaal hyppig drøftet, om Maltosen er direkte gjæringsdygtig eller ej. Monilia candida giver os et nyt Bidrag til dets Løsning, vi have nemlig i den en Gjærsvamp, som, uagtet den mangler inverterende Fermenter, dog i Følge Ovenstaaende kan fremkalde en temmelig kraftig, om end langsom Alkoholgjæring i Maltoseopløsninger. Heraf følger, at en foregaaende Omdannelse af denne Sukkerart til Druesukker i hvert Fald ikke er nødvendig, for at den skal kunne blive underkastet en Alkoholgjæring.

Vi ere hermed komne til det interessanteste Punkt i denne Alkoholgjærsvamps Livshistorie: Skjøndt den, som anført, mangler det kemisk opløselige Ferment, Invertin, forgjærer den dog Saccharosen. Hidtil blev ellers i den moderne Kemi og Fysiologi Saccharosen henført til de ikke direkte gjæringsdygtige Sukkerarter.

Mine Forsøg i denne Retning anstillede jeg med Renkulturer i de tohalsede Kolber med steriliserede Opløsninger af Rørsukker (10 og 15 %), dels med dels uden Kvælstofforbindelser og Næringssalte. I det sidste Tilfælde var Udviklingen af Gjæringsskum temmelig svag, i det første derimod meget kraftig. Paa forskjel-

lige Stadier under Gjæringen blev der udtaget Prøver til kemiske Undersøgelser; herved blev der bestandig paavist, at den tilstedeværende Sukkerrest vedblev at være Saccharose; af Invertsukker fandtes intet Spor. I Overensstemmelse hermed var der ej heller Invertin tilstede hverken i Vand- eller Glycerin-Udtræk af Gjæren. Vi have altsaa virkelig for os en Alkoholgjærsvamp, som er i Stand til at forgjære Saccharose direkte uden foregaaende Inversion, og heraf følger da tillige, at denne Sukkerart under visse Omstændigheder er direkte gjæringsdygtig.

Af de Forsøg, som til forskjellig Tid bleve anstillede i den Retning, meddeles følgende:

En tohalset Kolbe med en 10 % Opløsning blev inficeret med rigelig Gjær, mellem hvis Celler fandtes lidt af den Næringsvædske, hvori de vare avlede.

Efter	20 Døgns Forløb	var der	dannet	0,7	Vol.	%	Alkohol,
—	2 Maaneder	—	—	1,35	-	-	—
—	4 —	—	—	2,25	-	-	—
—	6 —	—	—	3	-	-	—
—	8 —	—	—	3,7	-	-	—
—	12 —	—	—	4,5	-	-	—
—	27 —	—	—	4,9	-	-	—

Den gjærende Vædske blev endvidere prøvet med Lakmospapir, med Fehlings Reagens og i et Polarisationsapparat efter 20 Døgns og efter 8, 12 og 27 Maaneders Henstand. Den reagerede stedse surt, men reducerede ikke, og den drejede bestandig Polarisationsplanet til Højre; kogtes den derimod først med svag Saltsyre, saa fremkaldte den en stærk Udskilning af rødt Kobberforilte. Heraf maa sluttes, at der idelig var en Rest af Saccharose tilbage, og at den under Gjæringen dannede Syre ikke har kunnet invertere denne. Ved den anstillede Prøve viste det sig, at Cellerne i den 27 Maaneder gamle Kultur vare levende.

I et andet Forsøg anvendtes en 15 % Rørsukkeropløsning, og Gjærcellerne, som anbragtes heri, vare i Forvejen meget nøje udvaskede med steriliseret Vand for at fjerne den tilstedeværende Næringsvædske.

Efter	4 Maaneder	fandtes	1,1	Vol.	%	Alkohol,
—	12 —	—	2,7	-	-	—
—	16 —	—	2,8	-	-	—

Ogsaa i dette Tilfælde blev det afgjort, at der under hele Forsøget ingen Inversion fandt Sted. Begge Forsøgene bleve anstillede ved almindelig Stuevarme.

Den Mulighed foreligger naturligvis, at Rørsukkeret i Cellernes Indre kan blive omdannet til Invertsukker, og at dette derefter strax opbruges. Jeg har imidlertid forgjæves søgt derefter; men selv om saadant dog skulde være Tilfældet, saa bliver Resultatet i hvert Fald dette, at denne Gjærsvamp i den nævnte Retning forholder sig paa en anden Maade end alle de andre hidtil undersøgte. Ogsaa det Spørgsmaal stillede jeg mig, om dens Mangel paa Evne til at udvikle Invertin skulde være begrændset til et bestemt Udviklingsstadium hos den. Mine Forsøg viste imidlertid, at den hverken som Gjærcelle eller som Skimmelsvamp med Mycelieudvikling inverterede Opløsninger af Rørsukker.

Naar den i længere Tid dyrkes ved høje Temperaturer, f. Ex. i Nærheden af 40° C., er den meget tilbøjelig til, især under ugunstige Ernæringsforhold, at frembringe en rig Syredannelse. Er der i disse Tilfælde Saccharose i Vædsken, saa vil en større eller mindre Del deraf kunne blive inverteret, men dette har naturligvis Intet at gjøre med Invertinudsondring. Som Exempel kan her anføres nedenstaaende Forsøgsrække:

En Renkultur af unge, kraftige Celler blev i rigelig Mængde overført i to tohalsede Kolber, hvoraf den ene kun indeholdt en Rørsukkeropløsning, den anden tillige lidt Gjærvand. Med Undtagelse af denne Forskjel i Næringsvædskens Sammensætning vare begge Kulturerne ens. De bleve stillede ind i Thermostaten ved 35—36° C. Efter 2 Døgns Henstand var der i begge dannet et rigeligt Gjærbundfald, og paa begge Vædskers Overflade fandtes stærkt udviklet Gjæringsskum. De reagerede surt paa Lakmospapir, men reducerede ikke Fehlings Vædske. Forsøget fortsattes, og da Kolberne havde staaet 5 Døgn ved den nævnte høje Temperatur, syntes Gjæringen hovedsagelig at være standset. Kolben, hvori der foruden Saccharosen ogsaa fandtes Gjærvand, forholdt sig som sidst, Vædsken fremviste intet Spor af Inversion; i den anden Kolbe, hvor Cellerne havde befundet sig under de ugunstige Ernæringsforhold, fandtes derimod nu en Antydning deraf. Efter Kogning med svag Saltsyre gave begge Vædsker en meget stærk Reduktion af Fehlings Reagens, et Tegn paa, at der fremdeles var rigelig Saccharose tilstede.

Vædskerne fra de i det Foregaaende omtalte Gjæringsforsøg bleve til forskjellig Tid ogsaa underkastede en kemisk Undersøgelse i andre end de allerede beskrevne Retninger. Herved blev det fastslaaet, at den under Gjæringen udviklede Luftart i alle Tilfælde var Kulsyre, og at Destillatet bestandig gav Reaktion for Æthylalkohol. Det havde Lugt deraf og

gav ved Antænding den sædvanlige Vinaandflamme; opvarmet med stærk Svovlsyre og krystalliseret eddikesurt Natron blev det omdannet til Eddikeæther, og ved Opvarming med en Blanding af chromsurt Kali og fortyndet Svovlsyre blev det iltet til Aldehyd; den sidstnævnte Omdannelse fandt ligeledes Sted under Paavirkning af Platinsort.

For at bestemme, hvilket Kogepunkt og hvilken Vægtfylde Destillatet i vandfri Tilstand maatte have, bleve 30 Liter-Kolber, hvori fandtes en Opløsning af 10 % Saccharose i Gjærvand, inficerede med en ung, kraftig Vegetation og derpaa henstillede ved almindelig Stuevarme. Efter 27 Døgn fandtes der ikke længere makroskopiske Tegn til Gjæring; der havde udviklet sig en Hinde og et rigeligt Gjærbundfald i alle Kolberne. Vædsken indeholdt 2 Vol. % Alkohol og var uden Inversion; den tilbageblevne Sukkerrest var Saccharose. Allerede heraf kunde sluttes, at Vegetationen fremdeles var en fuldstændig Renkultur, og i samme Retning gik ligeledes den mikroskopiske Prøve. Ved gjentagne Destillationer med vandbindende Midler erholdtes tilsidst et vandfrit Destillat, der viste alle de foran berørte Reaktioner, og hvis Brydningsindex var 1,361, Kogepunkt 79° C., Vægtfylde ved 17,5° C. 0,795, altsaa kun kunde bestemmes som Æthylalkohol.

De Biprodukter, der navnlig under en langvarig Eftergjæring træde frem, ere hidtil ikke blevne undersøgte saaledes, at jeg kan sige noget Bestemt derom.

Da denne Art, som jeg nu ved talrige Forsøg har paavist, forgjærer Saccharose uden foregaaende Inversion, og i Næringsvædsker, hvori der ikke findes andre Sukkerarter end denne, formerer sig kraftigt, ligger det nær at antage, at den ogsaa benytter Saccharosen som saadan til Opbygning af sine Celler, og at altsaa denne Sukkerart under de her givne Forhold ikke blot er direkte gjæringsdygtig, men tillige direkte kan assimileres.

Monilia candida udmærker sig fremfor flere andre Alkoholgjærsvampe ved sin Evne til at taale Indvirkningen af høje Temperaturer. I Olurt og i en Blanding af Rørsukker og Gjærvand udviklede den sig f. Ex. kraftig og fremkaldte livlig Gjæring ved 40° C., og efter at være bleven indtørret ved 42° C. i Løbet af 1—2 Døgn, saa at Gjærmassen i en Morter kunde stødes til et fint Pulver, vare dog flere af Cellerne endnu levende.

Skjøndt den er en kraftig hindedannende Form, formaar den dog ikke saaledes som Mycod. cerevisiæ at udvikle sig i spirituøse Vædsker; Udsæd i undergjæret Øl gav nemlig aldrig en fuldstændig Hindedannelse, og Udviklingen var overhovedet meget

ringe. Naar Forsøget anstilledes ved Temperaturer mellem 24 og 35° C. og saaledes, at en Infektion fra Luften kunde finde Sted, blev den derfor ogsaa hurtig overvældet af Eddikesyrebakterier og af Mycoderma cerevisiæ.

Resultater.

Hermed ere vi komne til Slutningen af denne Gruppe af saccharomyceslignende Svampe uden Endosporer. Kun faa af Arterne kunne i Gjæringsvirksomhed maale sig med de ægte Saccharomyceter, og ingen, naar Talen er om at forgjære Maltose. Iblandt de 10 undersøgte fandtes overhovedet kun een (Monilia candida), som fremkaldte Gjæring i Opløsninger af denne Sukkerart. Det var ligeledes almindeligt at træffe Arter, som slet ikke formaa at fremkalde Alkoholgjæring; Saccharomyceterne stille sig, som det erindres, anderledes, idet der iblandt dem kun fandtes een (Sacch. membranæfaciens), som mangler denne Evne, og i den store Gruppe af de øvrige kun faa (Sacch. Marxianus, Sacch. exiguus og nogle faa andre), som ikke kunne forgjære Maltose.

Medens i den sidstnævnte artrige Slægt Mangelen paa Evne til at fremkalde Alkoholgjæring faldt sammen med Mangelen af Invertin og kun iagttoges hos den netop nævnte Sacch. membranæfaciens, var det derimod hyppigt hos de undersøgte Ikke-Saccharomyceter at finde Arter, som mangle Invertin, og som desuagtet fremkalde Gjæring. Iblandt disse formaar dog kun Monilia candida at forgjære Saccharosen som saadan; dette var overhovedet den mærkeligste Iagttagelse, der blev gjort. Fæste vi Blikket paa de to Funktioner, Invertinudsondring og Gjæring, saa se vi, at alle mulige Kombinationer finde Sted i denne Afdeling; der findes Arter, som mangle begge Funktionerne, Arter, hos hvilke begge findes, og endelig Arter, hos hvilke den ene findes og den anden fattes.

Medens det store Flertal af Saccharomyceter spiller en fremragende Rolle i Industrien, har denne Gruppe af Ikke-Saccharomyceter derimod i den Henseende en meget ringere Betydning. De talrige Arter med svag Gjæringsevne kunne under disse Omstændigheder overhovedet næppe komme i Betragtning, og da der kun iagttoges en, nemlig Monilia candida, med Evne til at forgjære Maltose, og tilmed uden særlig Kraft i den Retning, saa maa de anses for at være uden praktisk Betydning i Bryggeri-

og Brænderidriften. Fra de aabne Svalebakker i Bryggerierne komme de til alle Aarets Tider hyppig med Urten i Gjærkarrene og kunne her efterhaanden optræde i kjendelig Mængde, men en skadelig Indgriben af dem er ikke paavist.

Som alle de hidtil undersøgte Alkoholgjærsvampe angribe de af Arterne, der overhovedet besidde Gjæringsevne, med Lethed Dextrose- og Invertsukkeropløsninger; det er derfor meget sandsynligt, at idetmindste nogle tage en mere eller mindre fremragende Del i Gjæringen af Drue- og anden Frugtvin.

I denne Gruppe fandtes endnu flere Exempler end i foregaaende paa det Forhold, at Arter, som i morfologisk Henseende ikke kunne skjelnes fra hverandre, dog kunne vise sig helt forskjellige i deres Forhold til Sukkerarterne, saa at de netop derved blive skarpt karakteriserede.

Alle optraadte med Gjærcelle-Vegetation, kun nogle faa tillige som Skimmelsvampe med et fuldstændigt Mycel. Som bekjendt, findes der i Naturen en stor Række Svampe, henhørende til Systemets forskjellige Afdelinger, der under visse Dyrkningsforhold kunne udvikle saccharomyceslignende Celler (ɔ: Celler, som i Næringsvædsker formere sig ved Knopskydning i Lighed med de ægte Saccharomyceter, men som mangle Endosporedannelsen). De Bary har allerede i 1864 paavist saadanne hos Exoascus og i 1866 hos Dematium; morfologiske Beskrivelser i samme Retning findes hos Bail og Reess og i den nyere Literatur temmelig hyppig, navnlig i Zopfs Afhandling om Fumago og i Brefelds om Brandsvampene. At der i intet af disse Tilfælde er Tale om Saccharomyces, er fremhævet. Det kan nu godt tænkes, at de af mig under Navn af Sacch. apiculatus, Pasteurs Torula og Monilia candida behandlede Arter ogsaa kun ere Udviklingsformer af højere Svampe; for Øjeblikket mangle imidlertid Beviserne herfor, og omvendt foreligger ogsaa den Mulighed, at de ere selvstændige Arter, som ikke optræde med andre end de af mig beskrevne Former.

4. Mucor.

Naar man foretager indgaaende Studier af de talrige til denne Slægt hørende Arter, viser det sig ikke blot, at kun et mindre Antal deraf hidtil ere blevne undersøgte, men tillige, at de foreliggende Beskrivelser som oftest ere utilstrækkelige til med Sikkerhed at afgjøre, om en given Form er beskreven eller ej; endog om de i Literaturen saa hyppig omtalte Arter, Mucor Mucedo og Mucor racemosus hersker der stor Uklarhed.

Mucor-Arterne ere som bekjendt meget udbredte Skimmelsvampe, der fra gammel Tid af ere berømte for deres Gjæringsvirksomhed, og de have derfor bestandig frembudt stor Interesse for Gjæringsfysiologien. Det er ogsaa særlig i den Retning, at mine efterfølgende Studier gaa; de ere udførte efter samme Plan som de foregaaende.

Mucor erectus Bainier.

Under dette Navn modtog jeg fra Dr. Eidam i sin Tid en Skimmelsvamp, der temmelig nøje stemmer overens med de systematiske Beskrivelser af Mucor racemosus, og som vistnok ogsaa hører til de Arter, der ere blevne blandede sammen dermed. Eidam fandt den paa raadne Kartofler i Juli i sit Laboratorium. Den findes beskreven i Annales des sciences naturelles, Botanique 1884, og i III Bind af Kryptogamen-Flora von Schlesien.

Mucor erectus hører til Slægtens kraftige Alkoholgjærsvampe, i en vis Henseende overgaar den endog almindelig Bryggeriundergjær. I Kulturer i Ølurt, som bleve anstillede ved almindelig Stuevarme, gav den

efter	14	Døgn	1,7	Vol.	%	Alkohol,
—	1½	Maaneder	6	-	-	—
—	2½	—	8	-	-	—

Lignende Kulturer gave ved 25° C.

efter	14	Døgn	1,8	Vol.	%	Alkohol,
—	1½	Maaneder	5,8	-	-	—
—	2½	—	7	-	-	—

I Modsætning til, hvad vi iagttoge hos Monilia candida, har den højere Temperatur altsaa ikke forøget Gjæringsenergien hos denne Art.

Som man ifølge Ovenstaaende kunde vente, fremkaldte den ogsaa Alkoholgjæring i Maltoseopløsninger, i Saccharoseopløsninger derimod ikke, og den inverterede ejheller disse.

I en Opløsning af 10 % Dextrose i Gjærvand gav den ved 25° C.

efter	4	Døgn	1,8	Vol.	%	Alkohol,
—	15	—	3,5	-	-	—

Den hører til de Svampe, som i særlig Grad udmærke sig ved at kunne fremkalde Alkoholgjæring i Dextrinopløsninger, og den formaar tillige at omdanne Stivelse til reducerende Sukker.

Mine Undersøgelser over disse Forhold ville blive meddelte i en senere Afhandling.

Hverken denne eller nogen anden af de undersøgte Mucorineer formaar at forgjære Lactose.

Mucor spinosus van Tiegh.

Med dette Navn betegner van Tieghem en Mucor, hvis Columella er besat med tornformede, ofte uregelmæssige Udbygninger.

Materialet til mine Undersøgelser blev mig for nogle Aar siden godhedsfuldt leveret af Hr. Dr. med. F. Rasmussen. Senere optraadte denne Art ogsaa spontant paa Urt-Gelatine her i Laboratoriet.

Den er ligesom Mucorineerne overhovedet meget variabel. I Kulturer paa det sidstnævnte Næringssubstrat finder man f. Ex. ikke sjelden Exemplarer, hos hvilke de omtalte Udbygninger paa Columella ere indskrænkede til bakterielignende Forlængelser, og ligeledes saadanne, hos hvilke den er glat. Herved tabes følgelig den væsentligste Karakter og netop den, hvorefter Arten modtog sit Navn. Ogsaa kan her fremhæves, at Columella med vorteformede Fremragninger findes hos flere andre Arter, f. Ex. hos den pathogene Mucor corymbifer. Et nøjere Studium viser, kort sagt, her som overalt paa dette Omraade, hvor mangelfuld vor systematiske Viden er.

I Forsøg, som bleve anstillede ved 22° C. og med Ølurt som Næringsvædske, gav den

efter 4	Døgn	0,5 Vol. %	Alkohol,
— 1	Maaned	2,8 - -	—
— 2	—	4 - -	—
— 5	—	4,8 - -	—
— 6½	—	5,4 - -	—

I en anden lignende Kultur fandtes efter 1 Aars Henstand ved almindelig Stuevarme 5,5 Vol. % Alkohol. Grændsen synes under disse Forhold her at være naaet.

Gayon angiver, at Mucor spinosus ikke formaar at danne mere end 1—2 Vol. % Alkohol i Ølurt. Ifald vi virkelig have arbejdet med den selvsamme Art, hvilket som anført ikke er muligt med fuld Sikkerhed at afgjøre, antager jeg, at Grunden til den Differens, der findes mellem hans og mine Bestemmelser, ligger deri, at han har afbrudt sit Forsøg paa et forholdsvis tidligt Standpunkt.

En Kultur i en Maltoseopløsning gav hurtigt tydelige Gjæringstegn, og efter 8 Maaneders Henstand indeholdt den 3,4 Vol. $^0/_0$ Alkohol.

I Rørsukkeropløsninger fremkaldte den hverken Gjæring eller Inversion.

Efter at være dyrket 16 Døgn ved 25° C. i en Opløsning af 10 $^0/_0$ Dextrose i Gjærvand gav den 2 Vol. $^0/_0$ Alkohol.

Denne Art har saaledes i alle Prøverne udviklet en svagere Gjæringsenergi end foregaaende.

Mucor Mucedo L.

Den Vegetation, hvormed mine Experimenter bleve anstillede, erholdt jeg paa frisk Hestegjødning, som havde ligget nogle Dage under en Glasklokke; den stemmede temmelig nøje overens med den systematiske Beskrivelse af Mucor Mucedo. Sporangiebærerne vare dog hyppigt grenede. Et for Arten væsentligt Kjendetegn bevarede den under alle Dyrkningsforhold, nemlig Mangelen af »Gemmendannelse«.

Efter 15 Døgns Kultur i Urt ved 23° C. udviklede den 0,4 Vol. $^0/_0$ Alkohol. I en lignende Kultur, men som blev anstillet ved almindelig Stuevarme, fandtes

efter $2^3/_4$ Maaneders Forløb 1 Vol. $^0/_0$ Alkohol,
— 6 — — 3 - - —

En saadan Kolbe, som havde staaet 1 Aar i Laboratoriet, indeholdt kun 3,1 Vol. $^0/_0$; Alkoholdannelsen synes altsaa under disse Omstændigheder ikke at kunne gaa videre.

Den gav en svag, men tydelig Alkoholgjæring i en Næringsvædske, bestaaende af 5 $^0/_0$ Maltose i Gjærvand.

I en Opløsning af 10 $^0/_0$ Dextrose i Gjærvand dannede den

efter 15 Døgn ved 25° C. 0,5 Vol. $^0/_0$ Alkohol,
— $1^1/_2$ Maaneder - — 0,8 - - —

Invertin udviklede den ikke og fremkaldte ikke Gjæring i en Saccharoseopløsning, derimod gav den ligesom flere andre Mucor-Arter heri en kraftig Vegetation.

Ifølge foranstaaende Undersøgelser hører denne Art til de svagere Alkoholgjærsvampe.

De i mine Forsøg med Ølurt og Dextroseopløsninger fundne Alkoholmængder stemme godt overens med de af Brefeld og Fitz opgivne. Om Forholdet til Maltose gives i nærværende Afhandling for første Gang Oplysning.

Vi gaa derefter over til en Art, som skarpt adskiller sig fra de foregaaende derved, at den udvikler Invertin.

Mucor racemosus Fres.

Denne Art er ligesom den foranstaaende meget udbredt og findes paa lignende Steder som denne. Det Materiale, hvormed de efterfølgende Experimenter bleve anstillede, erholdt jeg fra en svagt gjærende Vædske, der i Sommertiden strømmede ud fra nogle beskadigede Rødder paa Ælmetræer.

I Urtkulturer ved almindelig Stuevarme dannede den

efter 14 Døgn	1,3	Vol.	%	Alkohol,
— 3 Maaneder	4,7	-	-	—
— 12 —	7	-	-	—

Som man af Foranstaaende maatte vente, forgjærer den ogsaa Maltose, men ligesaa lidt som de andre Mucor-Arter viste den kraftige Gjæringsfænomener i en Opløsning deraf.

I den saa ofte omtalte Opløsning af 10 % Dextrose i Gjærvand dannede den ved 25° C.

efter 14 Døgn	1,5	Vol.	%	Alkohol,
— 1½ Maaneder	2,6	-	-	—

Det blev tidligere berørt, at den udvikler Invertin; som en Følge heraf kan den ogsaa omdanne Rørsukkeret til Invertsukker og derpaa forgjære dette.

I et Forsøg, som blev anstillet ved 25° C. med 10 % Rørsukker i Gjærvand, fandtes saaledes

efter 14 Døgn	1,1	Vol.	%	Alkohol,
— 1½ Maaneder	2,3	-	-	—

Mine Resultater stemme, for saa vidt en Sammenligning kan finde Sted, temmelig nøje overens med Pasteurs og Fitz's. Ligesom Fitz og senere Brefeld iagttog ogsaa jeg, at Mucor racemosus udvikler Invertin. Rigtigheden heraf er imidlertid bleven dragen i Tvivl af de franske Gjæringsfysiologer. For nogle Aar siden havde Gayon fundet, at Mucor Mucedo, M. circinelloides, M. spinosus og Rhizopus nigricans mangle Evnen til at danne det nævnte Ferment; denne Iagttagelse har man i Frankrig været tilbøjelig til at tilskrive en større Almengyldighed, end der virkelig tilkommer den. Duclaux gaar i sin Chimie biologique endog saa vidt, at han ligefrem betegner Fitz's Undersøgelse som urigtig. I sit Svar herpaa hævder Fitz ikke blot Rigtigheden af sin egen Iagttagelse, men udtaler tillige sin Mistillid med Hensyn til Gayons

Forsøg. Mine Undersøgelser have vist, at Gayon vel har Ret deri, at et stort Antal Mucorineer mangle Invertin, men paa den anden Side have de ogsaa i Overensstemmelse med Fitz bragt det sikre Resultat, at idetmindste en af Arterne, der kan bestemmes som Mucor racemosus, udvikler dette Ferment. De fremkomne Misforstaaelser have deres væsentligste Grund i den Forvirring, der endnu hersker med Hensyn til Opfattelsen af Species.

Foruden den nærmest foregaaende har jeg tillige fundet en anden Art eller Varietet, der udvikler Invertin. Grunden til, at jeg dog ikke nærmere omtaler den, er denne, at Differensen imellem dem er en saadan, at det vel kunde tænkes, at den ene kun er en Afændring af den anden. Sikkert er det altsaa i hvert Fald, at der iblandt Mucorarterne ogsaa findes Exempel paa Invertinudsondring, og saaledes, som Sagerne staa for Øjeblikket, bliver dette en af de væsentligste Karakterer, naar vi skulle bestemme Species.

I Aarenes Løb har jeg tillige havt Lejlighed til at foretage mere og mindre indgaaende Undersøgelser af flere andre Arter end de her omhandlede. Hvad de opstillede Hovedspørgsmaal angaar, forholde de sig alle som den større Gruppe af de beskrevne: Ingen forgjærer Lactose eller Saccharose, de mangle alle Invertin og fremkalde tydelig Alkoholgjæring i Opløsninger af Dextrose og Maltose, nogle danne dog kun ringe Alkoholmængder.

Resultater.

Med Hensyn til sit Forhold til Sukkerarterne udmærker denne Slægt sig altsaa derved, at dens fleste Species ikke udvikle Invertin, og at alle, for saa vidt de overhovedet fremkalde en tydelig Alkoholgjæring, forgjære Maltose; deres Gjæringer foregaa langsomt, og først efter en forholdsvis lang Tid naa de de højere Alkoholprocenter. Sammenligne vi Arternes Gjæringsevne, saa finde vi snart, at der gjør sig en betydelig Forskjel gjældende. Iblandt de nøjere behandlede danne i den Henseende Mucor erectus og Mucor Mucedo de to Yderpunkter. Medens den førstnævnte i Ølurt naaede indtil 8 Vol. % Alkohol, naaede den sidste derimod ikke 4, og der gives flere, som staa under denne, ja nogle, som egentlig ikke kunne kaldes Alkoholgjærsvampe.

De kraftige Gjærsvampe i denne Slægt sende i Almindelighed under Gjæringen deres Mycel, »Gemmendannelser« og Kuglegjær op til Vædskens Overflade og vise følgelig Overgjæringsfænomener. Ingen af Arterne anvendes i Industriens Tjeneste; de faa Forsøg, der af og til ere blevne gjorte dermed, fik intet praktisk Resultat.

Den Lighed, som i nogle Retninger findes mellem denne Slægt og Slægten Saccharomyces, blev, siden Bail i 1857 opdagede Kuglegjær- og »Gemmendannelserne« hos nogle af Arterne, skjænket stor Opmærksomhed, og Betydningen deraf i disse Studiers Barndom meget overdreven. For Øjeblikket findes næppe nogen kyndig Mykolog, der længere tror paa, at der skulde finde en genetisk Forbindelse Sted mellem de to nævnte Slægter, og Ligheden i fysiologisk Henseende er ej heller saa stor, som den i Almindelighed er bleven fremstillet.

At Kuglegjæren og de saakaldte »Gemmendannelser« ikke staa i et Nødvendighedsforhold til Alkoholgjæringen, kan ses deraf, at visse Arter, f. Ex. Mucor Mucedo, kunne udøve denne Funktion, uagtet de mangle disse Organer, og at de omvendt kunne optræde hos Arter, der ikke ere i Besiddelse af den nævnte Gjæringsevne. I Forbindelse hermed staar ogsaa den Iagttagelse, at de kunne udvikle sig i Næringsvædsker, som mangle Sukker, og hvori altsaa ingen egentlig Alkoholgjæring kan finde Sted. Paa den anden Side viser det sig, at de navnlig dannes i gjæringsdygtige Vædsker, og at de for de Arters Vedkommende, som ere udstyrede dermed, synes at spille en fremtrædende Rolle ved den nævnte Funktion. Ogsaa maa det erindres, at de findes hos alle Arter med udpræget Gjæringsevne og hos disse netop ere stærkt udviklede, medens de enten mangle eller kun ere lidet fremtrædende hos Arter med svag Gjæringsevne. Sammenholdes dette med, hvad vi ellers vide om disse Organer, bliver Resultatet, at de sikkert maa opfattes som Formeringsredskaber, der tillige have den Betydning at hjælpe Arten ud over vanskelige Perioder og at træde i Alkoholgjæringens Tjeneste. Og vi fæste da atter særlig Opmærksomheden paa den Kjendsgjerning, at deres Optræden falder sammen med en høj Udvikling af den sidstnævnte Virksomhed; en Forbindelse findes altsaa mellem begge, dog, som det blev vist, ingen absolut nødvendig. Med Forsæt har jeg ikke villet gaa ind paa Betragtninger over Afstamningsforholdene; jeg har kun ønsket at pege paa Kjendsgjerningerne og derved tillige paa de til disse knyttede interessante fysiologiske Spørgsmaal, der endnu vente paa en indgaaende experimentel Behandling.

5. Oidium lactis. Fres.

Ligesom nogle af de i det Foregaaende omhandlede Arter kan denne egentlig ej heller henføres til Alkoholgjærsvampene; en tydelig Gjæring giver den i hvert Fald ikke under de Forhold, hvor en saadan indtræder, naar Prøverne gjøres med Saccharomyceter eller med andre typiske Alkoholgjærsvampe.

Efter 2 Døgns Kultur i Urt ved 25° C. gav Vædsken endnu hverken Jodoform- eller Pasteurs Draabereaktion; først efter 5 Døgn viste disse Reaktioner, at der var dannet Spor af Alkohol. En kjendelig Kulsyreudvikling med Skumdannelse iagttoges hverken i denne eller i de efterfølgende Forsøgsrækker.

I Maltose- og Saccharose-Opløsninger fremkom der ligesaa lidt Gjæring som i Lactose-Opløsninger. Invertin udviklede den ej heller.

En Kultur i 10 % Dextrose i Gjærvand, som stod 4 Døgn ved 25° C., viste intet Tegn til Alkoholdannelse; efter 7 Døgns Henstand fandtes endelig en svag Draabe- og en stærk Jodoformreaktion.

Brefeld kom væsentlig til det samme Resultat[1]).

6. Tilbageblik.

Idet vi saaledes ere naaede til Slutningen af denne Række Undersøgelser, søge vi efter Sædvane i korte Træk og i en overskuelig Form at fastholde de vigtigste Resultater.

Om Slægten Saccharomyces (p. 222) lærte vi, at dens Arter falde i to Hovedgrupper, eftersom de udvikle Invertin og fremkalde Alkoholgjæring, eller de mangle begge disse Funktioner; af sidstnævnte fandtes kun en eneste Art (Sacch. membranæfaciens, p. 225). Alle Arterne i den førstnævnte Gruppe fremkalde en kraftig Alkoholgjæring i Saccharose- og Dextrose-Opløsninger og udvikle Invertin; de kløves atter i to Afdelinger, hvoraf den ene omfatter et Mindretal (Sacch. Marxianus, p. 222, og Sacch. exiguus samt nogle faa andre, p. 224), som

---

[1]) Om Opfattelsen af denne Art har ligesom om saa mange andre Mikroorganismer Meningerne været meget delte. Mine tidligere Arbejder derover findes i Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, I B. 2 H. 1879, p. 243, og I B. 4 H. 1882, p. 409.

mangle Evnen til at forgjære Maltosen, den anden omfatter derimod det store Flertal, som med Kraft ogsaa forgjære denne Sukkerart (p. 222).

I det næste Kapitel (p. 229) blev af praktiske Grunde en Række Arter, henhorende til forskjellige, endnu ubestemte Afdelinger af Systemet, sammenstillede. De stemme alle overens deri, at de have saccharomyceslignende Knopskydning og mangle Endosporer. I fysiologisk Henseende adskille de sig fra den foregaaende Slægt navnlig derved, at kun en eneste, nemlig Monilia candida (p. 234), formaar at forgjære Maltose, og dette uden stor Kraft. Arter, som mangle Invertin, og Arter med meget svag eller slet ingen Gjæringsevne ere her hyppige. Flere fremkalde dog kraftig Gjæring i Dextrose- og i Invertsukkeropløsninger, og hos den foran nævnte Monilia candida blev gjort den mærkelige Iagttagelse, at den forgjærer Saccharose som saadan, altsaa uden foregaaende Inversion. Fæste vi Blikket paa de to Funktioner, Invertinudsondring og Gjæring, saa se vi, at alle mulige Kombinationer finde Sted hos disse Svampe; der findes nogle, som mangle begge, nogle, hos hvilke begge ere tilstede, og endelig nogle, hos hvilke den ene findes, og den anden derimod ikke.

Den tredie Gruppe, hvormed vi anstillede vore Forsøg, indbefatter ligesom den første kun Arter, hørende til een Slægt, nemlig Mucor (p. 245). I fysiologisk Henseende dele de sig i to skarpt adskilte Afdelinger, eftersom de ere i Besiddelse af Invertin eller mangle dette Ferment; det Sidste er Tilfældet med de fleste. De udmærke sig derved, at de, for saa vidt de overhovedet fremkalde en tydelig Alkoholgjæring, da ogsaa forgjære Maltose om end rigtignok ikke med Kraft. I Arternes Gjæringsevne gjør der sig i denne som i den foregaaende Gruppe meget store Differenser gjældende, og der gives ogsaa flere Mucor-Arter, som egentlig slet ikke kunne kaldes Alkoholgjærsvampe.

Dette Sidste gjælder ligeledes om Oidium lactis (p. 252).

Betragte vi de undersøgte Svampes Forhold til Industrien, saa træder den Kjendsgjerning navnlig stærkt frem, at kun Slægten Saccharomyces omfatter Arter, der paa en hurtig og kraftig Maade kunne forgjære Maltosen. Som bekjendt indeholde Ølurten og Mæsken fortrinsvis denne Sukkerart. Bryggerierne og Brænderierne maa derfor søge deres Gjær iblandt de ægte Saccharomyceter; men at ikke alle Arter kunne udføre det onskede kemiske Arbejde, og at en planmæssig Udvælgen maa finde Sted, lærte ogsaa disse Studier os (p. 227). Hvilke betydningsfulde

praktiske Resultater derved ere opnaaede, omhandles i den følgende Afhandling.

De i tredie Kapitel behandlede saccharomyceslignende Svampe uden Endosporer (altsaa Ikke-Saccharomyceter) kunne, da de paa een Undtagelse nær mangle Evnen til at forgjære Maltose, næppe komme til at spille nogen fremragende Rolle i Bryggeri- eller Brænderidriften, derimod vel i Fabrikationen af Drue- og anden Frugtvin, idet nemlig flere af dem i Dextrose- og Invertsukkeropløsninger udøve en ligesaa kraftig Gjæringsvirksomhed som Saccharomyceterne. Flere af de i Vingjæringen vigtige Gjærsvampe høre muligvis netop hertil. Dette for den nævnte Industri betydningsfulde Spørgsmaal har dog endnu ikke været underkastet en Undersøgelse, og noget Bestemt kan derfor i Øjeblikket ikke siges derom. Pasteur, som er Hovedkilden, har ikke kunnet give Oplysning i den Retning, da han paa intet Sted skjelner mellem Saccharomyceter og Ikke-Saccharomyceter.

Angaaende Mucor-Arterne er kun dette at bemærke, at ingen anvendes i Industriens Tjeneste; det Samme gjælder om Oidium lactis.

Efterat vi saaledes have betragtet de undersøgte Organismer i deres Forhold til de fire Sukkerarter, kan det omvendt have sin Interesse at erholde en Oversigt over, hvorledes enhver af Sukkerarterne selv stiller sig.

Saavidt Forsøgene gaa, fandtes intet Exempel paa, at Maltosen gjennemgik nogen Omdannelse ved Indvirkning af Svampenes Invertin (de fleste Saccharomyceter og Mucor racemosus, p. 249); i de Tilfælde, hvor en Forgjæring fandt Sted, maa vi derfor antage, at denne har været direkte, og dette saa meget mere, som flere af Arterne, der fremkalde Gjæring i Opløsninger af denne Sukkerart, slet ikke ere i Besiddelse af Invertin (Monilia candida, p. 234, og alle de hidtil undersøgte Alkoholgjærsvampe af Slægten Mucor med Undtagelse af Mucor racemosus, p. 249). Ofte indtræder slet ingen Forgjæring af denne Sukkerart (Sacch. Marxianus, p. 222, Sacch. exiguus og nogle faa andre Saccharomyceter, p. 224, den saakaldte Sacch. apiculatus, p. 230, og Torula-Arterne, p. 231).

Med Hensyn til Saccharosen viste det sig, at den under Paavirkning af Alkoholgjærsvampene enten forgjæres direkte uden foregaaende Inversion (Monilia candida, p. 234) eller indirekte, nemlig efter at være bleven omdannet til Invertsukker (de fleste Saccharomyceter, nogle Torula-Arter, p. 231, og Mucor racemosus, p. 249), eller slet ikke (Sacch. apiculatus, p. 230, nogle Torula-Arter, p. 231, og de fleste Mucor-Arter, p. 246).

Den tredie Sukkerart, Dextrose, var den eneste, der af alle de undersøgte Alkoholgjærsvampe uden Undtagelse blev underkastet Gjæring, og i de Tilfælde, hvor en Sammenligning blev anstillet, viste det sig bestandigt, at den blev forgjæret hurtigere og med større Kraft end Saccharosen og Maltosen. Denne Iagttagelse har ogsaa sin Interesse for Kulturmethoderne; heraf følger nemlig, at man, naar Opgaven er at dyrke en eller anden ukjendt Art, sikrest naar Øjemedet ved at anvende Dextrose.

Om Lactosen blev det allerede i Afhandlingens Begyndelse fremhævet, at kun en af alle de hidtil kjendte Alkoholgjærsvampe formaar at forgjære den (p. 222).

Det er af sig selv indlysende, at de indvundne Resultater ogsaa kunne have deres Betydning for den analytiske Kemi, f. Ex. naar Talen er om at foretage Undersøgelser af Opløsninger, indeholdende flere Sukkerarter. Endnu foreligger der hverken nøjagtige kvalitative eller kvantitative Bestemmelser af Ølurtens Sukkerindhold. I de zymotekniske Skrifter er der kun Tale om Maltose, og hele Indholdet beregnes som saadan. At dette dog ikke er fuldstændig rigtigt, ved enhver Kemiker, som har foretaget Studier paa dette Omraade. Betragte vi imidlertid Rækken af Alkoholgjærsvampene, som ikke formaa at fremkalde Gjæring i Maltoseopløsning (Sacch. Marxianus, Sacch. exiguus, Sacch. apiculatus og Torula-Arterne), saa finde vi, at de i den til Forsøgene anvendte Ølurt dog i Reglen frembringe omkring 1 Vol. % Alkohol. Den herfor til Grund liggende Sukkermængde regnes i den sædvanlige kemiske Analyse ogsaa med til Maltosen, hvilket naturligvis er urigtigt. Et nøjagtigere Resultat vil man idetmindste i flere Tilfælde kunne naa ved at tage en eller anden af de netop nævnte Alkoholgjærsvampe til Hjælp.

Et af de Hovedspørgsmaal, der gaa gjennem alle mine Studier over Alkoholgjærsvampene, er Spørgsmaalet om Species og disses Begrændsning. I nærværende Afhandling blev det ligeledes skjænket en særlig Opmærksomhed. Vi saa da, at Arterne ogsaa indenfor samme Slægt, i deres Forhold til Sukkerarterne, kunne fremvise konstante og tydelige Differenser; i enhver af de tre store Grupper traadte Exempler frem i den Retning.

Talrige Beviser have vi saaledes erholdt derpaa, at Alkoholgjærsvampenes Forhold i den Henseende er af forskjellig Natur. De iagttagne Differenser finde i nogle Tilfælde en foreløbig Forklaring deri, at vedkommende Gjærart enten udvikler Invertin eller mangler dette Ferment, men som oftest staa vi blottede for enhver som helst Tydning og kunne kun iagttage Kjendsgjerningerne.

Ligesaa lidt som vi fatte, hvorfor to under Mikroskopet aldeles ensartede Celler i deres fysiologiske Virksomhed dog kunne være saa forskjellige, at den ene f. Ex. udvikler det nævnte Ferment, den anden derimod ikke, ligesaa lidt formaa vi at indse, hvorfor en Gjærcelle kan forgjære Maltose, og en anden af selvsamme Udseende derimod ikke; vor Viden tillader os kort sagt ikke at sætte Funktionerne i Forhold til Noget hos Cellen selv. Ingen af de hidtil opstillede Gjæringstheorier giver os Oplysning om disse fundamentale Spørgsmaal. Det er de store, endnu aldeles dunkle Problemer om Protoplasmaets Natur, der her møde os; men Problemer, som ikke længere kunne holdes borte fra den experimentelle Forskning. Ikke heller kan der let i den Retning tænkes et gunstigere Objekt end Gjærcellerne, hvor Bygningen er saa simpel og Funktionerne forholdsvis faa. De Undersøgelser, der hidtil ere fremkomne, bevæge sig altsaa, ret beset, endnu bestandig paa Overfladen, og en dybere Betydning faa de kun, for saa vidt de danne Forarbejder til det Nye, der skal komme.

December 1887.

Undersøgelser fra Gjæringsindustriens Praxis.

Af

Emil Chr Hansen.

Der gives Intet mere Tillokkende for Forskeren end at gjøre nye Opdagelser, men dobbelt stor bliver hans Glæde, naar han ser, at disse øjeblikkelig faa direkte Anvendelse i det praktiske Liv
Pasteur (Studier over Eddikefabrikationen).

I.

Indledning.

Expetimentelle Studier over Mikroorganismerne føre let ind paa praktiske Opgaver, til den ene Side i Lægekunsten, til den anden i Industriens Tjeneste. De theoretiske og de praktiske Problemer paa dette Omraade gaa Haand i Haand sammen og kunne ofte ikke adskilles. Dette har ogsaa vist sig at være Tilfældet med mine Arbejder, allerede de første fra 1878 bære Vidnesbyrd derom, og betragte vi den Række Afhandlinger, som jeg siden 1881 har udgivet under Fællestitelen »Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi«, saa træder dette endnu tydeligere frem. Nogle have hovedsagelig theoretisk Interesse, andre gribe derimod direkte ind i Gjæringsindustriens Praxis. Herved erholde de et dobbelt Præg, og eftersom den ene eller den anden af de nævnte Sider er fremtrædende, faa de Betydning for de to Klasser af Læsere, for hvilke de ere skrevne: Videnskabsmændene, der søge theoretiske Oplysninger, og Praktikerne, der ønske at indrette deres Drift efter rationelle Principer og at opnaa forhøjet materielt Udbytte.

Disse Overvejelser have bevirket, at jeg fra nu af agter at udgive dem i to Rækker, saaledes at de theoretiske Undersøgelser

fremdeles offentliggjøres i den foran nævnte Række, hvorimod de, som have direkte praktisk Anvendelse, skulle danne en ny under den ovenfor angivne Titel.

Allerede for flere Aar siden opfordrede Stifteren af Carlsberg Fondet og dets Laboratorium, afdøde J. C. Jacobsen, mig gjentagne Gange til at udgive saadanne Skrifter for Praktikere og ikke blot i mit Modersmaal for skandinaviske Læsere, men tillige i det tydske Sprog, for at de kunde finde Udbredelse i de Lande, hvor Gjæringsindustrien fra gammel Tid af særlig har udfoldet sig. Jeg lovede ogsaa dette; men nye Undersøgelser, som bestandig trængte sig frem, forhindrede mig hidtil deri. Først nu efter Jacobsens Bortgang er jeg bleven istand til at opfylde mit Løfte.[1])

Idet jeg altsaa herefter udgiver mine gjæringsfysiologiske Arbejder i de to nævnte Rækker, maa jeg paany minde om, hvad jeg i Begyndelsen af denne Indledning bemærkede, nemlig, at de theoretiske og praktiske Studier i Virkeligheden ikke strængt kunne adskilles. Ønsker Praktikeren en fuldstændig Forstaaelse af de Undersøgelser, der nærmest ere udarbejdede for ham, maa han tillige studere meget af det Øvrige, og omvendt vil ogsaa Fysiologen og Mykologen i den nu begyndte Række kunne finde Oplysninger, som tjene til at fuldstændiggjøre mine mere theoretiske Studier.

En Vejledning for mig ved Udarbejdelsen heraf vare de Spørgsmaal, der efterhaanden og fra forskjellige Sider bleve stillede til mig; ved at tage nøje Hensyn hertil, haaber jeg at være kommen Maalet nærmere og at have gjort en Brevvexling overflødig, som i de senere Aar har lagt meget Beslag paa min Tid.

Jeg udsender disse Arbejder med det Ønske, at de maa være til Nytte for den store, vigtige Industri, i hvis Tjeneste de ere udførte, og at de maa vise, at der fra dansk Side paa en hæderlig Maade tages Del i Fremskridtsarbejdet.

Carlsberg Laboratorium, Kjøbenhavn, Februar 1888.

---

[1]) En tydsk Udgave af nærværende Arbejder vil i Løbet af dette Aar udkomme paa R. Oldenbourgs Forlag i München under Titelen »Untersuchungen aus der Praxis der Gährungsindustrie«.

II.

Gjær-Rendyrkningen i Industriens Tjeneste.

---

1. Om Indførelsen af rendyrkede, planmæssigt udvalgte Gjærarter i Bryggeridriften og de herved vundne Resultater.

Hvori det nye Fremskridt bestaar.

Det vil være flere af mine Læsere bekjendt, at det i 1883 lykkedes for mig at indføre rendyrkede, planmæssigt udvalgte Gjærarter i Bryggeridriften. De første Forsøg bleve anstillede i det berømte Bryggeri Gl. Carlsberg ved Kjøbenhavn. Da jeg begyndte mine Arbejder i den Retning, var Gjærspørgsmaalet overalt i Bryggerierne en fuldstændig Gaade, det var det svageste Punkt i Driften. Kom der Vanskeligheder, byttede man Gjær med et andet Etablissement, ogsaa blandede man hyppig Gjær fra flere Bryggerier sammen. Undertiden kunde man vel herved erholde et godt Resultat, men ofte ogsaa et ligesaa slet eller et endnu slettere end det, der gav Anledning til, at man søgte ny Gjær. I alle Tilfælde var det en Arbejden paa Slump og i Blinde, man vidste kort sagt slet ikke, hvad man satte til sin Urt. Analysen, som den den Gang var mulig, gik ikke længere end i det Højeste til at afgjøre, om Gjæren var uren af Skimmel og Bakterier eller ej, men meget ofte viste det sig, at en Gjær, som man efter en saadan Undersøgelse maatte erklære for god, dog netop gav et slet Resultat. Herved blev jeg da naturligt ført til den Anskuelse, at Hemmeligheden maatte ligge i Gjærcellerne selv, og at disse tilsyneladende ensartede Celler dog muligvis kunde vise sig at tilhøre forskjellige Arter. Fra dette Udgangspunkt sprang efterhaanden mine Undersøgelser frem over Saccharomyces-Arterne, hvis nærmeste praktiske Frugter bleve en ny analytisk Methode

og Paavisningen af, at nogle af de almindeligste og værste Sygdomme i Øllet, som uheldige Smagsforandringer og Gjærtykhed, ikke skyldes Bakterier, men derimod visse bestemte Gjærarter.

Først da dette ved strængt gjennemførte Experimenter var fastslaaet saavel i Laboratoriet som i Driften selv, blev det indlysende, at det ikke var nok som hidtil at arbejde med en Gjær, der var fri for Bakterier og Skimmel, men at Sagen maatte tages fra et helt andet Synspunkt: Gjæren maatte kun indeholde een eneste Saccharomyces-Art, nemlig den for Bryggeriet gunstigste.

Hvorledes denne Reform af mig blev udført og fremdeles kunde føres videre, derom gav jeg en kort foreløbig Meddelelse i Zeitschrift für das ges. Brauwesen, München 1884, p. 273. I Laboratoriets eget Tidsskrift fandt jeg hidtil ikke Lejlighed til at behandle dette Æmne, og en samlet udførlig Fremstilling deraf gives overhovedet nu for første Gang. Paa en vis Maade kan det maaske være heldigt, at den fremkommer saa sent, nemlig over fire Aar efter, at Undersøgelserne hovedsagelig vare færdige. Jeg har i hvert Fald derved indvundet en større Erfaring og sættes i Stand til paa eet Sted at sammenfatte de betydningsfuldeste Bidrag fra det nævnte Tidsrum til Belysning af mit Arbejde, saavel for som imod dette. At citere disse Afhandlinger vilde her blive for vidtløftigt; de skyldes især: Amthor, Aubry, Belohoubek, Borgmann, Chodounsky, Delbrück, Flühler, Grønlund, Hayduck, J. C. Jacobsen, Alfr. Jørgensen, Lintner, P. Lindner, Morris, Marx, Thausing, Velten og Will.

De fleste af disse Forfattere have taget Parti for mine Bestræbelser, og efterhaanden ere de store Angreb forstummede. Smaa Angreb og Forsøg paa at nedsætte Betydningen af mine Arbejder træde imidlertid endnu jævnlig frem og ofte med den selvsamme Bevisførelse, som allerede overfor en tidligere Modstander er bleven fuldstændig gjendreven. Jeg har heraf lært, at den samme Sandhed atter og atter maa gjentages, hvis man vil, at den tilsidst skal trænge igjennem. Mine Svar og Berigtigelser i den Retning har jeg med Forsæt dog ikke villet rette til de bestemte Forfattere, som egentlig gave Anledning dertil, kun paa eet Sted gjorde jeg en Undtagelse herfra, nemlig med Hensyn til det i disse Dage offentliggjorte Angreb fra Pasteurs tidligere Medarbejder, Velten i Marseille.

Mine Forgængeres Bidrag.

Forinden vi gaa videre, vil det være nyttigt at kaste et Blik tilbage paa det, som gik forud for mit Arbejde; ligesom ethvert andet støtter det sig nemlig til Forgængernes. I dette Tilfælde er det først og fremmest Pasteur, hvorom Talen maa være.

Det var som bekjendt denne berømte Forsker, der i sit Værk, Études sur la bière 1876 egentlig for første Gang paa en indtrængende Maade gjorde det indlysende, hvilken mægtig Rolle Mikroorganismerne spille i Gjæringsindustrien. Han fremhævede heri de uheldige Forandringer (Sygdomme), som Øl kan blive underkastet, naar det angribes af Bakterier. Da disse ved deres Form let kunne skjelnes fra Gjærcellerne, anbefalede han en flittig Brug af den mikroskopiske Undersøgelse i Bryggerierne og gav Anvisning til at føre Gjæringerne saaledes, at Organismer udenfra kunde holdes borte, og til at fremstille, hvad han, rigtignok med Urette, kalder en absolut ren Gjær.

Paa Grundlag heraf mente Pasteur, at Ølfabrikationen skulde kunne finde Sted ikke blot til enhver Aarstid og overalt, men tillige uden Anvendelse af de hidtil benyttede kostbare Afkølingsmidler (Is og Ismaskiner). Udviklingen er imidlertid foregaaet paa en hel anden Maade og maatte foregaa saaledes, hvis man vilde holde fast ved de Hovedkarakterer, hvorved undergjæret Øl adskiller sig fra Vin. Og hvad den anbefalede Gjær angaar, da kunde den ejheller faa den ønskede Betydning, fordi den i Virkeligheden ikke var en Renkultur. Kjærnen i hans Værk finde vi ikke paa disse Omraader, men derimod i hans epokegjørende Lære om Bakterierne og de af disse fremkaldte Forstyrrelser.

En bestemt Methode til at erholde en Renkultur angiver han ikke, man maa i hvert enkelt Tilfælde prøve sig frem og gjennem en Række Kulturer saa vidt muligt søge at begunstige den Organisme, man ønsker, samtidig med, at man undertrykker de tilstedeværende Konkurrenter. Det Højeste, der ad denne Vej kan opnaas, er at fremstille en Gjær, som er fri for Bakterier og Skimmelsvampe, og selv dette kan ikke altid med Sikkerhed ske.

Muligvis har Pasteur kun villet, at Industrigjæren skulde være fri for Bakterier; saaledes har i hvert Fald Velten forstaaet ham. Tydeligt ses det ikke i hans Værk; dette vilde overhovedet have kunnet stifte en endnu større Nytte end Tilfældet er, hvis der deri klart havde været skjelnet imellem det, der kun er usikre Formodninger, og det, som er beviste Lærdomme, hvorpaa der kan bygges videre.

Vi have imidlertid ovenfor hørt, at nogle af de farligste og almindeligste Sygdomme hos Øllet, hvad Smagen, Lugten, Klarheden og Holdbarheden angaar, bero paa helt andre Aarsager, og at Kimene hertil netop udgjøres af en Del af Gjærcellerne selv. Selv om Pasteurs Gjær var fri for Bakterier, kunde den altsaa dog godt indeholde Sygdomskim, og den gav følgelig slet ingen Garanti. Heri maa en af Grundene søges til, at hans forøvrigt geniale Værk ikke kunde slaa Rod i Praxis. De Forsøg, som, kort efter dets Fremkomst, bleve anstillede paa Carlsberg, førte ejheller til Noget, og Pasteurs Fremgangsmaade blev derfor hurtigt opgivet.

Allerede i ældre Bryggeribøger før Pasteurs Tid findes den Anskuelse udtalt, at der gives forskjellige Slags Gjær, som fremkalde forskjellige Gjæringer, og som kunne give Øllet en forskjellig Karakter. Lignende Forestillinger finde vi ogsaa hos ældre Gjæringsfysiologer, f. Ex. hos Bail i 1857. Den almindeligste Opfattelse var da, at Bryggerigjæren hurtigt skulde kunne skifte Karakter, blot ved at føres fra et Bryggeri til et andet, ja mange gik saa vidt, at de antoge, at den kunde udvikle sig til Mucor-Gjær og gjennemløbe en hel Række Skimmelformer. Ved Siden heraf traadte den Opfattelse frem, navnlig gjennem Reess 1870, at Gjærarterne have en begrændset Udviklingskreds, og idet man da uden videre efter Cellernes Form alene opstillede Arter, kaldte man de pølsedannede Sacch. Pastorianus, de smaa ovale Sacch. ellipsoideus og de større ovale Sacch. cerevisiæ o. s. v. At ogsaa denne Betragtningsmaade er urigtig, vide vi nu. Der blev kort sagt gjættet paa alt Muligt, men Intet bevist; der stod altsaa bestandig tilbage at udfinde det Rigtige.

Væsentlig videre kom Pasteur ikke paa dette Omraade, thi de Methoder, der stode til hans Raadighed, tillode det ikke. I Kapitel V i det citerede Værk tales om forskjellige Alkoholgjærsvampe, og der drøftes paa flere Steder det Spørgsmaal, om de ere selvstændige Arter eller maaske kun Omdannelser af den almindelige Kulturgjær, en Afgjørelse heraf var det imidlertid ikke muligt at erholde; paa nogle Steder, f. Ex. p. 147, synes han at have den Opfattelse, at de optræde med bestemte Speciesmærker, paa andre, f. Ex. p. 193, derimod at mene, at de have en ubegrændset Evne til at variere, og at Species ikke findes iblandt dem. Paa samme Maade drøfter han Mulighederne for en Omdannelse af Bryggeri-Overgjær til Undergjær og omvendt, og medens hans Undersøgelse p. 189 nærmest viser hen til, at en saadan ikke finder Sted, kommer han senere til den Anskuelse, at

dette dog turde være Tilfældet, p. 213, og p. 333 Anm. giver han endog Anvisning til Bryggerne, hvorledes de efter hans Mening maa forholde sig, hvis de ville sikre sig imod, at deres Undergjær ikke skal blive omdannet til Overgjær, og her er vel at mærke ikke Tale om en foreløbig Omdannelse. Der diskuteres saaledes alle Muligheder, men et bestemt videnskabeligt Standpunkt blev ikke opnaaet. Hertil bidrog ikke blot den Omstændighed, at Videnskabens daværende Udvikling vel næppe tillod det, men tillige, at Pasteur ikke vilde gaa ind paa en botanisk Behandling af Problemet. Der gjøres i hans Værk intet Forsøg paa at skjelne mellem Saccharomyceter og Ikke-Saccharomyceter, alle Gjærceller med sædvanlig Knopskydning og med nogenlunde udpræget Evne til at fremkalde Alkoholgjæring stilles lige og betegnes snart som Saccharomyces, snart som levûres, ferments alcooliques etc.; men herved sammenblandes Organismer, henhørende til helt forskjellige Afdelinger i vort nuværende System. Under disse Omstændigheder kunde der selvfølgelig hverken blive Tale om at foretage en Analyse eller en planmæssig Udvælgen af Species.

Den Kritik, der maatte ligge i ovennævnte Redegjørelse, gjælder ikke det med Rette berømte Værk, men de Disciple, der fremdeles holde fast ved de uklare Standpunkter og med Forkjærlighed opsøge de dunkle Steder for deri at læse, hvad der ikke findes deri og efter den Tid, Værket blev udgivet, ikke kunde findes deri.

I Modsætning til Pasteur gik jeg fra Begyndelsen af ud paa at opdage botaniske Skjelnemærker hos de som Regel tilsyneladende ensartede Gjærceller. Og snart viste det sig ogsaa, at Gjærspørgsmaalets Løsning var ensbetydende med Spørgsmaalet om Saccharomyces-Arterne. Grunden til, at mine Studier skrede saa langsomt fremad, var den, at de Methoder, jeg forefandt, i de fleste Tilfælde vare ubrugelige, og at jeg selv først maatte udarbejde nye. Hvad Renkulturen angaar, gik jeg bestandig ud fra det Princip, at kun Udsæd af een Celle giver absolut Sikkerhed; ogsaa naar jeg anvendte Næringsgelatine, holdt jeg i Modsætning til Koch og hans Skole fast derved.

Idet mine Undersøgelser saaledes sprang ud fra andre Synspunkter end Pasteurs, lykkedes det at erholde praktiske og theoretiske Resultater, som ikke kunde vindes paa den af ham anviste Vej. Men at hans Værk var et saare vigtigt Forarbejde for mig, hvortil jeg i mere end een Retning kunde støtte mine Bestræbelser, skal altid erkjendes; det var for sin Tid det ypperligste, og det

har stiftet stor Nytte[1]). Maatte en Gang ogsaa min Lære og mine Methoder, naar de i Følge Forskningens Fremskridt skulle afløses af fuldkomnere, nogenlunde kunne fortjene en lignende Ros.

De vundne praktiske Resultater.

Da jeg i 1883 henvendte mig til Ejeren af Gl. Carlsberg, afdøde Kapt. J. C. Jacobsen, for at udbede mig Tilladelse til at anstille mine Forsøg i det Store i selve Bryggeriet, havde han ikke nogen god Tro til mine Planer. En af de væsentligste Indvendinger, som han fremsatte for mig, var, at en Renkultur af Bryggeri-Undergjær ikke kunde give en passende Eftergjæring, men at de vilde Arter, som jeg jo udelukkede, vistnok netop fordredes hertil.

Kort forinden jeg henvendte mig til ham, havde en Del af mine Undersøgelser imidlertid givet et slaaende Resultat i Praxis, hvilket i høj Grad talte for, at min Lære om Saccharomyces overhovedet maatte være rigtig. I en Afhandling om Sygdomme i Øl (se nærværende Tidsskrift 1883, p. 93) havde jeg udklaret den Sygdom, som i Tuborg-Bryggeriet ved Kjøbenhavn i Løbet af et Par Aar havde anrettet saa stor Skade, nemlig Gjærtykhed, og da Fabrikken ved paa en fornuftig Maade at anvende de givne Oplysninger hurtigt igjen kom i Orden, forelaa der saaledes her et haandgribeligt Bevis for mine Opdagelsers praktiske Betydning. Omtrent paa samme Tid viste der sig, som Jacobsen selv omtaler i sit Foredrag i teknisk Forening, en Vanskelighed i hans Bryggeri, idet Øllet nemlig begyndte at antage en ubehagelig bitter Smag og ilde Lugt. Efter den Tids Opfattelse søgte han ganske naturlig Aarsagen hertil i en Bakterieinfektion, og da en saadan ikke fandtes, i en Fejl ved Urten, navnlig ved Humlen. Men heller ikke her var der noget at opdage. I en Afhandling fra 1882 havde jeg lejlighedsvis meddelt en lille Undersøgelse over en Saccharomycet, som frembragte et Øl af en lignende Beskaffenhed som det, hvorover der førtes Klage paa Gl. Carlsberg. Jeg udtalte da tillige den Anskuelse, at de vilde Gjærarter kunde fremkalde ligesaa store Forstyrrelser i Gjæringsindustrien som Bakterierne.

---

[1]) En udførligere Fremstilling af disse Forhold findes i Jørgensens literaturhistoriske Undersøgelse: »Ueber den Unterschied zwischen Pasteurs und Hansens Standpunkt in der Hefefrage«. (Zeitschrift für das gesammte Brauwesen, München 1888, p. 58).

At der ikke den Gang blev skjænket min Lære ret megen Opmærksomhed, var temmelig naturligt, thi den var endnu ikke tilstrækkelig begrundet, og hvad der særlig maatte indgyde Jacobsen Mistillid, var den Omstændighed, at den ikke stemmede overens med Pasteurs. I 1883 var jeg imidlertid kommen et Skridt videre frem, og det Held, jeg havde havt paa Tuborg, bevirkede da ogsaa, at jeg erholdt den ønskede Tilladelse. Prøverne bleve altsaa anstillede under de store Forhold i Driften selv, og Beviserne efterhaanden førte paa en uigjendrivelig Maade.

Af den urene Gjær udskilte jeg fire forskjellige Saccharomyces-Arter, og ved at experimentere dels med hver enkelt for sig og dels med Blandinger af dem viste det sig, at kun een gav normalt Øl med god Smag og god Lugt, som det ønskedes. Det er denne Art, der nu i Bryggeriverdenen er almindelig kjendt under Navn af Carlsberg Undergjær Nr. 1. Iblandt de andre fandtes den Art, hvormed jeg havde anstillet mine Forsøg i 1882, og hvoraf jeg i en af mine Afhandlinger fra 1883 havde givet en indgaaende Beskrivelse; jeg har der betegnet den med det foreløbige Navn, Sacch. Pastorianus I. Kun den var det, som fremkaldte Sygdommen. Bestandig viste det sig, at Øllet, som blev fremstillet ved Hjælp af den udvalgte Bryggeri-Gjærart for sig alene, blev fortrinligt, hvorimod en Tilsætning af Sacch. Pastorianus I bevirkede, at det fik den frygtede bitre Smag og ubehagelige Lugt. Dette Resultat fik stor Betydning, thi Jacobsen erkjendte nu, at der virkelig forelaa en Reform, og han aabnede hele sit store Bryggeri derfor. I Begyndelsen gik han endog hurtigere frem, end jeg egentlig selv ønskede. Hermed vare Kampene for denne Sag endte paa Gl. Carlsberg. Dette skete i 1884.

Jeg har meddelt disse Oplysninger fra de to nævnte Bryggerier, dels fordi de vise, hvorledes Udviklingen gik, og dels fordi de paa en levende Maade ville tale for den Reform, jeg ønsker at skaffe en saa stor Fremgang som muligt.

Prøven viste altsaa, at Jacobsens Betænkeligheder med Hensyn til Eftergjæringen vare ugrundede. Desuagtet blev senere fra andre Sider atter denne Tvivl udtalt. En Art Støtte syntes den at kunne finde i Brown's og Morris's Afhandling, On the non crystallisable products of the action of diastase upon starch (Journal of the chemical society, 1885).

For Øjeblikket har jeg kun hos engelske Forskere mødt denne Indvending; det synes saaledes, som om Fremstillingen af det alkoholrige engelske overgjærede Øl kunde lægge særlige Vanskeligheder i Vejen for Anvendelsen af Renkulturer. I danske

Overgjæringsbryggerier, hvor der fremstilles mindre alkoholrige Ølsorter uden egentlig Eftergjæring, har A. Jørgensen derimod siden 1884 med Held anvendt Methoden med nogle Tillæmpninger; fornylig er dette ogsaa, ifølge hans mundtlige Meddelelser, sket i et Par udenlandske Bryggerier, der væsentlig arbejde paa samme Maade som de engelske.

Det var navnlig ved Jacobsens Autoritet, at mine praktiske Forsøg i meget kort Tid bleve bekjendte saavel herhjemme som i Udlandet; dog bleve de som Regel selv af intelligente Bryggere betragtede med Mistillid. Denne Modstand vilde have kunnet forhindre Sagens Fremme i flere Aar, hvis ikke Aubry strax fra Begyndelsen af med Kraft og Dygtighed havde arbejdet derfor. Ham tilkommer Æren for at have banet Vejen for denne Reform i Tydskland. I Bøhmen var det senere Belohoubek, som gjorde Begyndelsen, i Norge Hejberg. Herhjemme bleve mine Bestræbelser støttede af A. Jørgensen og Grønlund. Jørgensens Laboratorium har navnlig udfoldet en betydelig Virksomhed. Ikke blot ere talrige skandinaviske Bryggerier derfra blevne forsynede med ren Gjær, men tillige en stor Del af Udlandets. I Frankrig var det Louis Marx, som tog Sagen i sin Haand; uden hans Indgriben vilde Fremskridtet næppe have afsat et eneste Spor i dette Land.

I de sidste Par Aar har jeg erholdt flere dygtige Medarbejdere iblandt de udenlandske Kemikere og Botanikere, som studerede under min Vejledning her paa Laboratoriet.

Gamle Carlsberg var altsaa det Bryggeri, der gik i Spidsen, og siden 1884 har det ligesom Ny-Carlsberg og flere andre Bryggerier baseret hele Driften paa mine rendyrkede Gjærarter. Gjærkarrene paa Gl. Carlsberg rumme 9000 Hektoliter Urt, og Paasætningsgjæren dertil er c. 2500 Klgr. Hermed produceres aarlig 200,000 Hektoliter Lager- og Exportøl. Produktionen paa Ny-Carlsberg er kun lidet mindre. De Værdier, hvorom Talen her er, beløbe sig altsaa hvert Aar til flere Millioner Kroner. Den allerstørste Del af denne Ølmængde er fremstillet ved Hjælp af een Art, nemlig den foran nævnte Carlsberg Undergjær Nr. 1; den mindre Rest med en anden ligeledes rendyrket Art, nemlig Carlsberg Undergjær Nr. 2.

Jeg har draget disse Talstørrelser frem for at vise, at der ikke er Tale om Bagateller eller om Forsøg i det Smaa, men derimod om fastslaaede Resultater i en stor Industri.

Kaste vi et Blik paa den Udbredelse, Reformen for nærværende Tid har naaet, saa finde vi, at den har fundet sin Vej til alle ølbryggende Lande; almindelig anvendt, endsige almindelig anerkjendt

er den dog endnu ikke, hvis saa var, vilde nærværende Afhandling ogsaa idetmindste tildels være overflødig.

I Danmark og Norge arbejde alle de større og ansete Bryggerier derefter. I Sverige er Begyndelsen gjort; det Samme gjælder om Finland, Bohmen og de andre østerrigske Lande, Schweitz, Nord-Italien, Frankrig, Belgien og Nordamerika. Almindelig udbredt og som fast Led i Driften af mange ansete Bryggerier findes den foruden i Danmark og Norge især i Rusland, Holland og Tydskland, navnlig i Bayern.

Fra Gl. Carlsberg er der ogsaa sendt rendyrket Gjær til Bryggerier i Asien, og fra Jørgensens Laboratorium saavel til Asien som til Australien og Sydamerika. Om Forsøgene ligeledes i disse fjerntliggende Egne sloge Rod, ved jeg endnu ikke. Der er bestandig kun Tale om Undergjæringsbryggerier.

Af det Foregaaende vil det allerede være indlysende, at mit System bringer betydelige praktiske Fordele med sig. Skulle vi nøjere angive, hvori de bestaa, vise de sig at være følgende:

Man sikrer sig et bestemt Resultat, en rationel Drift, hvor Alt tidligere mere eller mindre var baseret paa Slumpetræf.

Man sikrer sig imod Sygdomme i Øllet, som kunne foraarsage store Pengetab.

Man erholder en Gjær, der i Handelen med Paasætningsgjær har større Pengeværdi end den sædvanlige urene.

Og endelig bidrager man derved til, at Industrien hæves, noget, der i hvert Fald for den intelligente Praktiker altid maa have stor Interesse.

Et Fortrin ved disse Forbedringer er endvidere dette, at de ingen særlige Udgifter medføre, og at de derfor ogsaa ere tilgængelige for de mindre Fabrikker. Paa en heldig Maade adskille de sig herved fra, hvad der f. Ex. finder Sted, naar et Bryggeri gaar over til at anvende Ismaskiner i sin Drift.

At mit Arbejde paa mange Steder vilde blive misforstaaet og anvendt paa urette Maade, var let at forudse. Dette er ogsaa sket. Særlig Opmærksomhed har jeg derfor henvendt i den Retning og nøje optegnet de Tilfælde, jeg erfarede. I det Foredrag, som jeg 12 Juni 1887 holdt ved den østerrigske Bryggeriforenings Generalforsamling i Graz, dvælede jeg navnlig derved. Hvad jeg her meddeler derom, er et Udtog deraf med nogle Tilføjelser og nogle faa Ændringer. Det er altsaa om Misforstaaelserne og Fejlgrebene, vi skulle tale for om muligt tilsidst at komme ud derover.

En Misforstaaelse er det at tro, at den rene Gjær kan gjøre Alt. Det maa tvertimod fremhæves, at Fordringerne til Malten og

Urten o. s. v. blive de samme som tidligere. Begaar man Synder i disse Retninger, vil Øllet, selv om man anvender ren Gjær, dog blive mangelfuldt.

En Renkultur, som en Gang er indført i et Bryggeri, kan ikke i det Uendelige holde sig tilstrækkelig ren. Urten fra de aabne Svalebakker bringer navnlig i Sommer- og Efteraarsmaanederne Infektion af Bakterier og vilde Gjærarter med sig, det Samme gjælder om den mere eller mindre urene Luft, som især findes i Gjærkjældere, hvor man arbejder uden Luftrensning og uden Ismaskiner, ogsaa Redskaberne og Arbejderne selv føre let Smitte med sig. Om end en ren Gjær uden Fare kan benyttes en længere Tid end en uren under lige Forhold, kommer der altsaa bestandig et Tidspunkt, hvor det er nødvendigt at indføre en ny Renkultur. Hvornaar dette maa ske, kan kun med Sikkerhed bestemmes ved Hjælp af en Analyse. De lokale Forhold og Aarstiderne spille her en stor Rolle; en for alle Bryggerier og for alle Tilfælde gjældende Regel gives ikke; ogsaa maa det erindres, at de forskjellige Øl-Undergjærarter ikke ere i Besiddelse af den samme Modstandskraft overfor de ubudne Konkurrenter.

Mine Modstandere have grebet dette og overdrevet Betydningen deraf. Man har saaledes sagt, at den rene Gjær, efterat være kommen i Urten fra Svalebakkerne, strax blev bragt tilbage til sin tidligere urene Tilstand, og at Rendyrkningen derfor ingen Nytte var til. Det er rigtigt, at den strax inficeres, men aldeles urigtigt, at den i kort Tid som Regel skulde blive i den Grad inficeret, at den derved blev ubrugelig. Selv under meget uheldige Forhold gjør den rene Gjær bestandig sin Nytte og er altid at foretrække for den urene. Som Exempel kan jeg her meddele, at den Gjærart, som vi paa Gl. Carlsberg kalde Nr. 1, holdt sig tilstrækkelig ren i det nævnte Bryggeri 6—8 Maaneder, og den anden der benyttede Gjærart, Nr. 2, som hører til de lidet modstandsdygtige, i 2—4 Maaneder. Dette fandt Sted paa den Tid, da al Urten til Gjærkarrene endnu toges fra sædvanlige aabne Svalebakker. Her tænkes overhovedet kun paa Forholdene, som de ere i det store Flertal af Bryggerier; men i det Følgende omtales Apparater og Indretninger, hvorved saa at sige al Infektion forhindres.

En Indvending, som ofte er bleven rettet mod mine Bestræbelser, er denne: I et Bryggeri har man paa en Tid, hvor Alt gik godt med den gamle urene Gjær, indført en Renkultur til Prøve og nu nøje anstillet Sammenligning mellem Øllet, som de to Slags Gjær frembragte. Resultatet blev da, at der egentlig Intet var vundet ved den nye Gjær. Hvorfor altsaa ikke blive ved den

gamle Methode? Ja, hvis der virkelig var Methode deri, kunde det være godt nok, men det er netop det, der mangler. Bryggerne kunne, som anført, derigjennem aldrig faa Sikkerhed, men ere prisgivne store Svingninger og ukjendte Farer. Sikkerheden, en rationel Drift, det er det eneste Nye, den rene Gjær bringer. En fuldstændig Misforstaaelse er det at mene, at den skulde kunne give et bedre Produkt end det, som Bryggeren i det heldigste Tilfælde kan erholde med sin gamle urene Gjær. Hvis den rene Gjær er rigtig valgt, giver den netop dette, og modsat den urene, giver den det altid, saalænge den dyrkes nogenlunde under de samme Forhold.

En og samme Gjærart passer ikke til alle Bryggerier. Det har nemlig, som allerede berørt, ikke blot vist sig, at Kulturgjæren bestaar af forskjellige Arter eller Racer, men tillige at disse give Øl af forskjellig Beskaffenhed, forskjellig Holdbarhed, forskjellig Smag, og at de arbejde paa en noget forskjellig Maade i Gjær- og Lagerkjælderen. Hvert enkelt Bryggeri maa derfor planmæssig udvælge en saadan Art, som passer for dets Drift, og det er netop et af de væsentligste Fremskridt, som mine Arbejder have bragt, at Saadant nu med Sikkerhed kan udføres. At der findes Arter, som passe for et større Antal Bryggerier, har Erfaringen dog allerede lært. Saadanne bør de zymotekniske Laboratorier særlig opbevare som Stamformer. For vidt vilde man gaa, hvis det kom dertil, at hvert Bryggeri skulde have sin særegne Gjærart. Der er for Øjeblikket en Tendens i den Retning, og derfor har jeg ment at burde advare derimod.

En rendyrket Gjærart, udskilt af en almindelig uren Bryggerigjær, altsaa tagen fra en Blanding af i Reglen flere forskjellige Gjærarter, giver ikke nøjagtig det samme Produkt som Blandingen. I Smagen vil der navnlig næsten altid være en lille og undertiden ret kjendelig Forskjel. Det er saaledes en Misforstaaelse, naar flere Bryggere have ment, at den rendyrkede Gjærart skulde give dem Øl af nøjagtig samme Smag som det Øl, fra hvis urene Gjær vedkommende Gjærart oprindelig blev udskilt. De faa et finere og fremfor Alt et konstant Produkt, men et, der er noget forskjelligt fra det tidligere. Denne Kjendsgjerning kan ikke stærkt nok blive fremhævet. Et stort praktisk Fejlgreb er det derfor, naar Bryggeren pludselig, paa een Gang i hele sin Drift indfører den rene Gjær. Hans Øl vil nemlig da let brat faa en anden Karakter, hvilket hos flere Kunder kan vække Uvillighed. For-

andringen maa gjennemføres lidt efter lidt, og der sker da ikke Andet, end hvad der tidligere til Stadighed fandt Sted i ethvert Bryggeri. Naar den er vel indført, har man derved opnaaet et stort Gode. Disse Forhold har den afdøde Ejer af Gl. Carlsberg, Kapt. Jacobsen, paa en klar og indtrængende Maade fremhævet i sine Artikler om denne Sag, men desuagtet træde Misforstaaelserne og Fejlgrebene frem hver Dag.

Man kunde nu spørge mig, om man ikke ved at anvende Blandinger af en i Forvejen nøjagtig kjendt Sammensætning kunde indvirke paa Øllets Smag og herved erholde Variationer, som maaske kunde vinde Indgang hos Publikum. At Saadant ogsaa nu rationelt kan gjennemføres, er selvfølgeligt. Til Kulturgjæren sætter man da f. Ex. en vild Gjærart, der, som min Sacch. Pastorianus II, ikke fremkalder Sygdom. I nogle Tilfælde vil man kunne foretage denne Indblanding i selve Paasætningsgjæren, i andre derimod først ved Hovedgjæringens Slutning. Ogsaa har man det i sin Magt at fremstille garanterede Blandinger af forskjellige Bryggeri-Undergjærarter.

Men anbefale disse Blandinger, om de endog gjennem paalidelige Analyser ere fuldstændig garanterede, kan jeg ikke. Idealet for al Fabrikation er at arbejde saa simpelt og sikkert som muligt, og det er en afgjort Sag, at man lettere kan beherske een end flere Faktorer, selv om de alle ere fuldstændig kjendte.

Ved den franske Bryggeriudstilling i Paris 1887 holdt den fra Pasteurs Études sur la bière bekjendte Brygger Velten nogle Forelæsninger om Dyrkningen af Bryggerigjær. De ere fornylig offentliggjorte i Revue universelle de la Brasserie et Malterie Nr. 742 og 743.

Efter at have paavist den væsentlige Forskjel, der er mellem Pasteurs og min Methode, gjennemgaar han hver for sig og kommer herved til det Resultat, at Pasteurs absolut er at foretrække. Ved efter Pasteur at dyrke en almindelig Bryggerigjær i en Sukkeropløsning med Vinsyre eller i Ølurt, hvortil der er sat Karbolsyre og Vinaand, undertrykkes Bakterierne, og man erholder idetmindste i mange Tilfælde en Gjær tilbage, bestaaende af forskjellige Gjærarter, dels Kulturgjær, dels vild Gjær. Om Forholdet imellem disse behøver man ikke at bekymre sig, ligesaa lidt om, hvilke Arter de tilhøre; det er nok, at Bakterierne ere forsvundne. Min Lære, at visse Saccharomyces-Arter fremkalde Sygdomme i Øllet, gjælder ikke for Velten, og han fremhæver imod mig, at det er nødvendigt, at Bryggerigjæren skal bestaa af flere

Arter, hvis man vil erholde Aroma og Bouquet i Øllet. Som en Følge heraf mener han, at jeg har begaaet en Fejl ved at gaa ud fra eet eneste Species. Han meddeler, at man i Tydskland, særlig i Berlin, har fundet, at mine Reformbestræbelser bero paa en Fejltagelse, og at jeg selv i den nyeste Tid skal have erkjendt dette og derfor være vendt tilbage til Pasteurs gamle Fremgangsmaade.

De, som have fulgt min forangaaende Fremstilling, ville have set, at Velten befinder sig i en fuldstændig Vildfarelse. Ligesom fra Begyndelsen arbejder jeg ogsaa nu bestandig med een udvalgt Gjærart, og i Stedet for at tabe Tilhængere vinder mit System tvertimod uafbrudt flere. Fornylig har jeg ogsaa havt den Tilfredsstillelse at erfare, at det er blevet indført i de to største Bryggerier i Berlin selv og godkjendt af mine tidligere Modstandere i den derværende kgl. Landbohøjskole.

Mærkelig nok synes Velten at have overset, at Pasteur selv erklærer den af mig angivne Vej at være den rigtige (Bulletin de la société d'encouragement pour l'industrie nationale. Paris, Janvier 1887, p. 45).

Hr. Velten vil maaske kunne sætte igjennem, at Frankrig bliver et af de Lande, der sidst kommer med paa Fremskridtets Bane; men herved vil han ikke opnaa det, han dog sikkert ønsker, at gavne sit Fødeland.

Som ethvert Fremskridt, der skal føres ud i Livet for der at bekæmpe en gammel uheldig Praxis, har altsaa ogsaa dette havt sin Brydningstid. Modstanden er imidlertid i de sidste Par Aar bestandig bleven svagere. Takken herfor skyldes især mine dygtige Medarbejdere herhjemme og i Udlandet. Gjennemgribende Forbedringer ere vel ikke indførte siden 1884; en ikke ringe praktisk Betydning har dog det af Bryggeridirektør Kapt. Kühle og mig i Forening konstruerede Rendyrkningsapparat faaet. Herved sættes man nemlig i Stand til med korte Mellemrum at sende store Masser af rendyrket Gjær ud i Driften. En udførlig Beskrivelse deraf findes i det næste Kapitel.

En Forbedring, som ogsaa staar i nøje Forhold til Anvendelsen af mine rendyrkede Gjærarter, indførte afdøde J. C. Jacobsen i 1885 paa Gl. Carlsberg. Han opstillede nemlig da et Apparat, i hvilket den fra Bryggeriet kommende koghede Urt kan nedsvales og luftes uden at komme i Berøring med de i Luftens Støv værende Mikroorganismer. Det er en Modifikation af det saakaldte Veltenske Apparat; senere har Kapt. Kühle indført nye For-

bedringer derved[1]). Flere Aar i Forvejen havde den foran nævnte Brygger Velten i Marseille konstrueret et lignende, men en virkelig praktisk Betydning fik det hidtil ikke, thi det Væsentligste manglede. Hvad kunde det nemlig hjælpe at have en steril Urt, naar Gjæren, som man anbragte deri, var uren af Sygdomskim! Først da Gjærspørgsmaalet var løst, fik ogsaa Spørgsmaalet om Afskaffelsen af Svalebakkerne sin virkelige Berettigelse, og først da indførte Jacobsen de ovenfor berørte Apparater. Et Apparat efter det samme Princip som foregaaende, men ellers i flere Retninger forskjelligt derfra, har Hr. C. Jacobsen i den nyeste Tid opstillet paa Ny-Carlsberg. Nu er Tidspunktet kommet, og der er derfor ingen Tvivl om, at denne Forbedring efterhaanden vil holde sit Indtog i mange af de Bryggerier, hvor den rene Gjær har staaet sin Prøve, og saaledes tjene til at fuldstændiggjøre det nye System.

I den foregaaende Fremstilling er der bestandig tænkt paa Undergjæringsbryggerier; mine praktiske Arbejder have nemlig hidtil kun bevæget sig paa dette Omraade; at de dog ogsaa med passende Tillæmpninger ville kunne anvendes i de øvrige Grene af Gjæringsindustrien er sandsynligt, og hvad de danske Overgjærings-Bryggerier angaar, er det, som ovenfor berørt, allerede sket ved A. Jørgensen.

2. Den fabrikmæssige Fremstilling af rendyrket Gjær.

Forarbejderne.

Vi tage naturligt vort Udgangspunkt i selve Bryggeriet. Findes her en Gjær, som arbejder paa en tilfredsstillende Maade saavel under Hoved- som Eftergjæringen, og som, hvad der er det Vigtigste, giver et Produkt med de Egenskaber, vedkommende Brygger ønsker, da opstaar selvfølgelig Ønsket om at bevare den. I mange og maaske i de allerfleste Tilfælde vil Hovedmassen af en saadan Gjær bestaa af een Kultur-Art, og der vil kun findes en aldeles underordnet Indblanding af andre Mikroorganismer.

---

[1]) Om dette Apparat og dets Anvendelse se efterfølgende to Afhandlinger:

Just. Chr. Holm, Die Vorrichtungen in der Brauerei zur Kühlung und Lüftung der Würze. (Zeitschr. für das ges. Brauwesen, München 1887, Nr. 20). Anton Petersen, Einige Bemerkungen über das Lüften der Würze, (Sammesteds 1888, Nr. 3).

Under disse Omstændigheder skyldes Resultatet ogsaa væsentlig Kulturgjæren; den vil for sig alene give det ønskede Produkt.

Strax i Begyndelsen, da jeg tog fat paa praktiske Studier over Bryggeri-Undergjær og vild Gjær, gjorde jeg den Iagttagelse, at naar begge vare sammenblandede i Paasætningsgjæren, saa optraadte sidstnævnte i Overfladeøllet med et i Forhold til Kulturgjæren ringere Antal Celler ved Hovedgjæringens Begyndelse end ved dens Slutning. Førend den rene Gjær blev indført, havde jeg en rig Lejlighed til at iagttage dette i Gjærkarrene saavel paa Gamle- som paa Ny-Carlsberg. Senere erholdt jeg samme Resultat ved at anstille planmæssige Forsøg, dels i smaa Kar i en Gjærkjælder og dels i Kolber i Laboratoriet, med sædvanlig Ølurt som Næringsvædske og med i Forvejen bestemte Gjærblandinger af saavel Carlsberg Undergjær Nr. 1 som Nr. 2 og med mine tre Sygdomsgjærarter, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III og Sacch. ellipsoideus II. At det af mig saaledes paapegede Forhold er hyppigt i Bryggeridriften er hermed bevist, og meget taler for, at det muligvis endog kan opstilles som Regel. I et særligt Arbejde over Gjærarternes Konkurrenceforhold, hvortil en Del Undersøgelser ere gjorte, vil jeg maaske senere ogsaa kunne belyse dette Forhold nærmere. Hvad der er meddelt, giver en Forklaring af, hvorfor det, idetmindste i mange Tilfælde i Bryggerierne, viser sig at være en heldig Fremgangsmaade at benytte Urt, der netop er kommen i Gjæring, som Paasætningsgjær, i Stedet for, som det sædvanlig sker, at vente til Hovedgjæringens Slutning for at tage den da opsamlede Bundgjær. Der er selvfølgelig dog ikke Tale om paa den Maade at opnaa en virkelig Renkultur.

Det er paa Grund af disse Iagttagelser, at jeg i mine Forelæsninger og Øvelser bestandig har angivet, at Prøven til Analysen for vild Gjær helst tages ved Hovedgjæringens Slutning, og Prøven til Fremstilling af den ønskede Renkultur af Bryggerigjæren helst ved Hovedgjæringens Begyndelse, i begge Tilfælde fra Overfladeøllet i vedkommende Gjærkar. Denne Oplysning har faaet en ikke ringe praktisk Betydning.

Er den Bryggerigjær, hvoraf en Renkultur skal fremstilles, nogenlunde ren, vil man i Følge Ovenstaaende paa Gjæringens første Stadier have en Vegetation, som nærmer sig mere eller mindre til Renkulturen. Praktisk er det derfor til vort Forsøg at tage en Gjennemsnitsprøve fra Overfladen af Urten i et Gjæringskar, naar et svagt Skumdække netop har dannet sig, altsaa i Gjæringens Begyndelse. Forholdsvis let er det heraf at fremstille

en Renkultur af den Bryggerigjærart, der er i Overvægt, og som vi i Følge forangaaende Overvejelse jo netop ønske.

Er Bryggeriet langt fjernet fra vedkommende Laboratorium, vil det i Reglen være det Heldigste at begynde Arbejdet med almindelig Bundgjær, og hvis den ikke er svækket, kan den anvendes strax, som den er, i modsat Fald anstilles først en Gjæring dermed i en Kolbe med steriliseret Urt. Saasnart Gjæringen her er begyndt, tages da lidt af Vædsken for at benytte de deri svævende, nydannede Celler til Rendyrkningen. Ved disse Arbejder stræbe vi ikke blot efter at erholde Vegetationer, hvori den ønskede Art er i Overvægt, men tillige derefter, at dens Celler ere unge og kraftige. Dette Sidste har nemlig Hensyn til den Behandling, de blive underkastede under Arbejderne for at fremstille en Renkultur af dem. Methoden hertil har jeg tidligere beskrevet. (Se mine Afhandlinger i nærværende Tidsskrift 1882 og 1883, men navnlig 1886, p. 152).

I det Foregaaende blev det Tilfælde behandlet, at en enkelt Gjærart var i Overvægt i Gjærblandingen, hvorfra vi toge vort Udgangspunkt, og saaledes, at den fortrinsvis udførte det hele Arbejde og bestemte Produktets Karakter. Der forekommer imidlertid ogsaa Tilfælde i Bryggerierne, hvor ikke een Art, men hvor flere jævnbyrdes dele Herredømmet, og følgelig ogsaa i Forening afgjøre Resultatet. Under disse Omstændigheder vil en Renkultur af en af Arterne i Reglen give et Produkt af helt andre Egenskaber end Blandingen. De forskjellige Arter, hvoraf denne bestod, kunne vel hver for sig udskilles, og det er følgelig muligt til enhver Tid at fremstille Blandingen, med nogen Møje endog saaledes, at Arterne indtræde i de ønskede Forhold; men da vi ikke i Længden formaa at beherske disse, ville de, som have den største Kraft i den Konkurrence, der indtræder, trænge sig frem og herved øjeblikkelig fremkalde Forstyrrelser. Et konstant Produkt kan under disse Forhold kun erholdes med stor Vanskelighed, og Rendyrkningen har derfor her egentlig ingen praktisk Værdi. Vilde man endelig ind paa den Bane, maatte man lave hver enkelt Portion Paasætningsgjær tilrette for sig efter den en Gang for alle bestemte Regel. Som Bryggeriforholdene ere for Øjeblikket, kan jeg ikke tænke mig en saa omstændelig Fremgangsmaade gjennemført, og jeg har derfor ogsaa allerede i det foregaaende Kapitel raadet derfra.

Iblandt de Kulturarter, som man har udskilt af en saadan Blanding, vil man ofte finde flere, som ere værdifulde for Praxis. Om deres Egenskaber kan man dog Intet afgjøre, før de ere

prøvede. Og det maa da erindres, at Forsøgene med smaa Maal, som de kunne anstilles i Laboratoriet, kun give ringe Oplysning i den Retning; Prøven maa anstilles i Driften selv under de der herskende Forhold. Det tager altsaa i dette Tilfælde flere Maaneder, førend vi kunne erholde et Resultat.

Antage vi, at vor Rendyrkning er lykkedes, og at vi i en Kolbe have en kraftig Vegetation af den udvalgte Art, saa bør vi som Regel først sørge for at bevare den for kommende Tider. Forsigtighedshensyn byde os aldrig at lade os nøje med een Kolbe, vi henstille derfor en Reserve, saaledes at vi have Sikkerhed for, at der til enhver Tid er en levende og ren Vegetation tilstede.

I Kolber med Ølurt bevare de fleste Saccharomyces-Arter deres Liv i Aar og Dag ved almindelig Stuevarme, naar de ikke paavirkes af direkte Sollys; i nogle Tilfælde fandt jeg dog, at Døden indtraadte efter mindre end et Aars Forløb, og under Paavirkning af stærkt Sollys og af den dermed følgende høje Temperatur, som da, omend sædvanlig kun for kortere Tid, indtræder, dø de meget hurtigere. Man bør derfor opbevare disse Kulturer i et mørkt Skab, eller i hvert Fald i et, der kun er udsat for indirekte Lys. I Følge nogle Undersøgelser af Duclaux om Gjærcellers Levedygtighed i Ølurt kunde man antage, at denne Vædske i den nævnte Retning yder Alt, hvad man kan ønske sig; mine ovenfor omtalte Forsøg stemme imidlertid, som det ses, ikke aldeles dermed. Den bedste Opbevaringsvædske, jeg kjender, naar Talen er om flere Aars Henstand, er ikke Ølurt, men en vandig Opløsning af Saccharose; jeg plejer at anvende en 10 % Opløsning hertil. I denne har jeg endnu ikke iagttaget, at de deri udsaaede Celler ere bortdøde, dog ere nogle af mine Kulturer over 8 Aar gamle.

Den af mig angivne Opbevarings-Methode i steriliseret Filtrerpapir (se min Afhandling om Askosporedannelsen, nærværende Tidsskrift, II B. II H. 1883, p. 63) er meget praktisk, naar det gjælder om Forsendelser af smaa Gjærprøver, og bliver ogsaa hertil almindelig anvendt af de Laboratorier, der beskjæftige sig med Rendyrkning af Gjær fra Bryggerier, idet nemlig Prøverne fra disse indsendes paa denne Maade. Som Resultat af de Forsøg, jeg havde anstillet indtil Foraaret 1883, meddelte jeg i den ovenfor citerede Afhandling, at Gjærceller i Filtrerpapir i nogle Tilfælde bevare deres Livskraft i 20, i andre derimod kun i 5 Maaneder. Ved senere Forsøg saa jeg, at en fuldstændig Bortdøen ikke fandt Sted før efter henved 5 Maaneder, og at de allerfleste Arter ikke naa 2 Aars Liv under de angivne Forhold; kun een fandtes levende efter 2½ Aars Forløb. Forsøgene bleve anstillede med

unge, kraftige Celler, og Præparaterne laa i en Skuffe ved almindelig Stuevarme. Det erindres, at Gjæren efter denne Opbevaringsmethode anbringes i en Konvolut af Filtrerpapir. Paa denne Maade kan man imidlertid som Regel ikke bevare en Renkultur. Ønsker man dog hertil at anvende det samme Princip, kan det ske ved Hjælp af den af mig p. 302 beskrevne Kolbe med Bomuld.

I Følge de anførte Grunde ville Kolber med Saccharoseopløsning i Almindelighed være det bedste Opbevaringsmiddel, og vi se altsaa, at det ikke er forbundet med nogen Vanskelighed for de zymotekniske Laboratorier at have et helt Lager af de prøvede Kulturgjærarter, saaledes at Bryggerierne til enhver som helst Tid kunne faa dem, de ønske.

Min gamle Fremgangsmaade.

Have vi altsaa sikret os vor Renkultur til Brug for kommende Tider, skulle vi derefter gaa over til at fremstille den store Gjærmængde, som Bryggeriet kræver. Hertil anvendes følgende Apparater: 4—5 Pasteurske tohalsede Kolber, hver rummende c. $1^1/_4$ Liter, og 4 Metalkar som Fig. 2, hver paa 10 Liter.

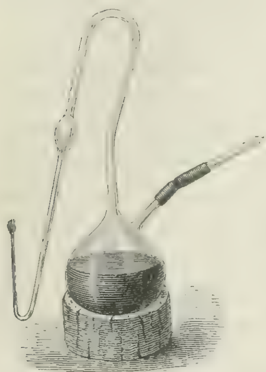


Fig. 1.

Hosstaaende Fig. 1 viser os den Pasteurske Kolbe med en lille Ændring, idet det bøjede Rør nemlig har modtaget en Udvidelse. Herved yder den en endnu større Sikkerhed end tidligere. I en $^1/_8$ Liter Kolbe som Afbildningen have vi vor Renkultur; de større Kolber paa $1^1/_4$ Liter, som nu skulle bruges, maa dog hellere forsynes med et bøjet Rør, hvis Diameter i Udspringsstykket er forholdsvis større; i den Henseende kan jeg henvise til Fig. 8, *d*, p. 300. Forøvrigt anbefales den i Fig. 1 afbildede Model. Kolben staar paa en Korkbrix; det rette Rør er forsynet med en Kautschukslange, hvori der er anbragt en Glasprop; i det bøjede Rørs Munding findes en Asbestprop.

Metalkarret (Fig. 2) er lavet af fortinnet Kobber og bygget efter samme Princip som ovennævnte Glaskolbe.

Udspringsstykkerne af Rørene *a* og *b* fortsættes af Kautschukslanger, der paa sædvanlig Vis lukkes med Glaspropper; det nederste Rør, *b*, er desuden forsynet med en Klemme. Metalstykket af dette Rør gjøres saa kort som muligt, og Klemmen,

der lukker for Kautschukslangen, anbringes saa nær som muligt ved Rørets Munding. Fra Karrets øverste Parti udgaar det krumbøjede Rør, som ved *c* er delt i to Stykker, hvilke forbindes ved en Kautschukslange. Ved *d* er Rørets Munding lukket med en fast presset Bomuldsprop, der holdes fast af en Glashætte; *e* er den foran omtalte Udvidelse paa Røret til Sikring mod Infektion, navnlig kort efter Steriliseringen.

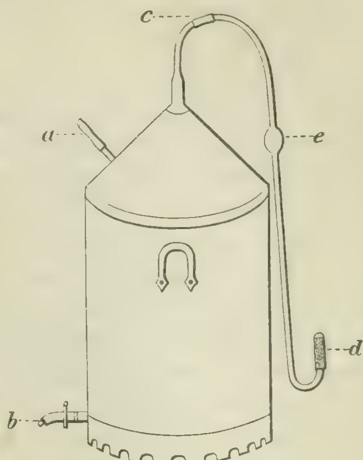
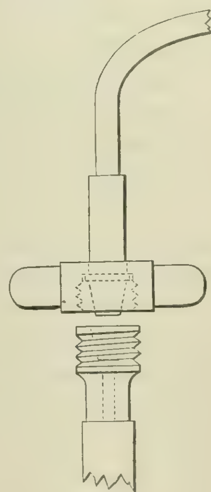


Fig. 2.

Den i Fig. 2 fremstillede Model viser det bøjede Rør i fast Forbindelse med selve Kolben. Man kan imidlertid ogsaa efter Assistent Poulsens Forslag forbinde det med Karrets Top ved Hjælp af en Bindeskrue med Løber og tilsleben Prop (Fig. 3). Proppen og den dertil svarende Fordybning ere ligesom Skruegangen indvendig i Løberen angivne ved punkterede Linier. Denne Ændring sætter os altsaa i Stand til at tage hele Røret af, naar Karret skal renses, og vi behøve her ikke Kautschukleddet (Fig. 2, *c*). Rensningen foregaar forøvrigt i begge Tilfælde med Lethed; det bliver derfor en Smagssag, hvilken Form man helst vil vælge. En Hovedfordring er det, at K a r r e t o v e r a l t e r f u l d s t æ n d i g t æ t, s a a a t e n I n d s u g n i n g k u n k a n f i n d e S t e d g j e n n e m d e t b ø j e d e R ø r s M u n d i n g.


Fig. 3.

Som Næringsvædske anvendes almindelig humlet Urt, som den fremstilles i Bryggerierne til Lagerøl; hermed fyldes Glaskolberne $^2/_3$. Den simpleste Maade, hvorpaa Sterilisering foretages, er ved Kogning paa Sandbad. Naar Vædsken er kommen godt i Kog, lukkes Kautschukslangen, som hidtil har været aaben, med Glasproppen, hvorpaa man en kort Tid lader Dampene strømme ud af det bøjede Rør, derefter stilles Kolben paa sin Brix, og Asbestproppen anbringes. Hvis man vil, kan man selvfølgelig

ogsaa sterilisere ved Hjælp af Damp. Ved den beskrevne Kogning opnaas ikke altid, at alle Kimene blive dræbte. Overføre vi f. Ex. Prøver fra en større Række af de saaledes behandlede Kolber i Næringsvædsker, der ere særlig gunstige for Udvikling af Bakterier, og stille disse Kulturer ind i en Thermostat ved 27—30° C., saa ville vi finde, at enkelte af vore Urtkolber have indeholdt levende Bakterier. Disse komme imidlertid ikke til Udvikling i den kogte Urt, og da vi hele Tiden kun skulle arbejde med den, faar den paapegede Mangel slet ingen Betydning[1]); praktisk taget, have vi i Virkeligheden en steril Vædske.

Steriliseringen af Urten i de store Metalkar er forbunden med noget større Vanskelighed end ovenfor blev beskrevet. Ofte hørte jeg fra Elever, som havde deltaget i mine Kursus, Klager over, at de ikke kunde arbejde med disse Kar; jeg giver derfor i det Følgende en udførlig Oplysning om Fremgangsmaaden: Efterat Karret er vel renset, fyldes c. 5 Liter Vand deri; derpaa koges det 1 Time med Røret *a* og ligeledes med det bøjede Rør aabent. Man lukker nu Kautschukslangen ved *a* med en flammerenset Glasprop og fortsætter Kogningen 15 Minutter, i hvilken Tid Dampene altsaa strømme gjennem det bøjede Rør; imedens dette sker, mindskes Gasblusset noget, for at Trykket ikke skal blive for stort. Kort forinden Blusset slukkes, aabnes for Røret *b*, for derigjennem at udtappe c. 100 Kub.-Centim. af det koghede Vand. Herved sikrer man sig, at dette Rør og dets Indhold blive steriliserede. Derpaa lukkes ligesom tidligere med Klemmen og Glasproppen, sidstnævnte opvarmer man dog først temmelig stærkt. Kogningen er hermed forbi, og der staar kun tilbage at presse Bomuldsfiltret *d* fast om det bøjede Rørs Aabning forneden.

Forinden Urten skal fyldes i Karret, maa Vandet naturligvis fjernes, idetmindste den største Del deraf. En Blanding af 7 Liter Urt og 1/2 Liter Vand vil være passende. Steriliseringen foregaar paa samme Maade som med Vandet; dog anvendes mod Slutningen en større Forsigtighed. Medens man af Røret *b* udtapper 100 Kub.-Cent. af den kogende Urt, og medens man i Løbet af 1/4 Time lader Dampene strømme gjennem det bøjede Rør, opvarmer man saaledes tillige sidstnævnte stærkt med et andet Gasblus end det,

---

[1]) Urten har overhovedet stor Modstandskraft overfor Bakterier; dette gjælder f. Ex. om flere af de i Drikkevand optrædende; se min Afhandling »Methode zur Analyse des Brauwassers in Rücksicht auf Mikroorganismen« (Zeitschr. für das ges. Brauwesen, München 1888, Nr. 1).

der anvendes til Kogningen, og Bomuldsfiltret (*d*) anbringes derefter med stor Omhu. Man maa, kort sagt, nøje sorge for, at den under Afkolingen indsugede store Luftmængde ikke skal føre levende Kim med sig ned i Vædsken. Vore Kar, som bleve behandlede paa den Maade, stode i Maaneder, uden at Vædsken blev angreben af Mikroorganismer.

Forinden de skulle tages i Brug, maa der gjennem Røret *b* udtages Prøver af hver enkelt; man opvarmer da det bøjede Rør, for at den under Vædskens Udstrømning indsugede Luft kan blive steriliseret.

Saalænge vi til vore Arbejder kunne nøjes med forholdsvis smaa Kolber, lave vi naturligvis disse af Glas. Uagtet dette Materiales Skrøbelighed frembyde de nemlig væsentlige Fordele derved, at de ved deres Gjennemsigtighed tilstede en Kontrol med blotte Ojne af den Vædske, som de indeslutte. Skal denne Kontrol imidlertid have nogen Betydning, saa maa Kolben ikke være større, end at vi udenfra med nogenlunde Sikkerhed kunne undersøge ethvert Parti af Vædsken og dens Bundfald. Med et Rumfang af 1—2 Liter vil denne Grændse, set fra det fremhævede Synspunkt, vistnok være naaet. Gjøre vi nemlig vore Glaskolber endnu større, kan Vædsken i dem godt indeholde smaa Kolonier af forskjellige Mikroorganismer, uden at vi kunne opdage dem, og Kolonier af en saadan Størrelse, som vi, hvis de havde været tilstede i de mindre Kolber med deres forholdsvis ringe Vædskelag, strax vilde have bemærket. Kun naar de tilstedeværende Mikroorganismers Angreb antage meget store Dimensioner, opdage vi det i de store Glasballoner; men under disse Omstændigheder ville vi kunne gjøre den samme Iagttagelse ved at udtage smaa Prøver af vore Metalkar. En Glaskolbe paa 10 Liter og derover yder os altsaa i den nævnte Retning ikke større Hjælp end et lignende Kar af Metal, og da sidstnævnte er stærkere og lettere at behandle, vælge vi naturligvis dette.

Have vi saaledes erholdt en steril Urt i vore Kolber og Kar, vil det være heldigt at lade den staa en Tidlang, for at Vædsken deri efterhaanden kan optage Ilt fra Luften gjennem det bøjede Rør. I nogle Forsøg viste det sig nemlig, at Gjæren, som var avlet i luftet Urt, strax i Begyndelsen gav god normal Klaring, hvorimod den samme Gjær fra et aldeles lignende Forsøg, men med ikke luftet Urt, gav slet Klaring og først efter længere Tids Forløb blev normal. Lignende Iagttagelser bleve mig ogsaa godhedsfuldt meddelte af Aubry og A. Jørgensen.

Spørgsmaalet fortjener en nøjere Undersøgelse. Efter den Erfaring, der foreligger, maa det altsaa tilraades, helst at arbejde med luftet Urt. Ogsaa i anden Henseende er dette vigtigt, nemlig hvis man ønsker at erholde en nogenlunde fast Bundgjær i vedkommende Kar. Dette gjælder især, naar Talen er om Arter som Carlsberg Undergjær Nr. 1. At Urten i de omtalte Kolber og Kar virkelig ved Henstand i almindelig Stuevarme optager Ilt fra Luften, var det let at paavise. Efter 4 Maaneders Henstand indeholdt den steriliserede Urt endog forholdsvis mere fri Ilt end den normale luftede, som fra Svalebakkerne gaar ned i Gjærkjælderen.

Med en kraftig Vegetation af vor Renkultur inficeres nu de 4 eller 5 foran omtalte Glaskolber med Urt, egentlig behøves kun 4; den femte er en Reserve for det Tilfælde, at et Uheld skulde indtræffe. Disse henstilles ved almindelig Stuevarme og ville efter mindre end en Uges Forløb have dannet rigeligt Gjærbundfald. Den største Del af Øllet hældes da bort; man lader kun saameget blive tilbage, som der behøves for at løsne Gjæren; den overføres derpaa i de 4 Metalkar, idet hvert inficeres fra sin Kolbe. Dette sker gjennem Røret *a*, Fig. 2. At alle disse Arbejder maa udføres saaledes, at ingen Infektion udenfra kan finde Sted, er en Selvfølge. Hertil kræves særlig Kjendskab og en ikke ringe Øvelse; gjennem en Beskrivelse kan det ikke læres. Dagen efter vil allerede en kjendelig Gjæring være indtraadt, og man gjør da rigtigt i at borttage Filtret (*d*). Ønsker man at fremskynde Arbejdet, kan det ske derved, at man gløder det bøjede Rør og samtidig ved Rystning fjerner en Del af den dannede Kulsyre. I Almindelighed vil der efter henved 7 Dages Forløb være avlet saa megen Gjær, som der kan dannes, og de fire Kar indeholde da Paasætningsgjær til c. 1 Hektoliter Urt.

Hermed har Arbejdet i Laboratoriet naaet sin Slutning, det Øvrige sker i Gjærkjælderen selv. I denne stille vi nu et Kar op, som rummer c. $1^1/_2$ Hektoliter. Det maa være fuldstændig renset, nylig ferniseret og dækket med et løstliggende Laag, saa at Kulsyren kan slippe ud. Urten skal være luftet, og under almindelige Bryggeriforhold maa vi derfor lade os nøje med den, som anvendes til de øvrige Gjærkar.

Efterat vi ved Hjælp af en Gasflamme have bortbrændt Støvet paa Overfladen af de 4 Kar med Renkulturen, hældes Indholdet ud i den omtalte Urt, idet man naturligvis ved Rystning sørger for, at al Gjæren kommer med.

Ønsker man ikke at indblande den delvis forgjærede Urt, eller kan Gjæren ikke fra Laboratoriet føres direkte ned i vedkommende

Gjæringskjælder, men skal først indpakkes til Forsending, saa maa man i Reglen lade Karrene staa et Par Dage længere, for at Gjæren kan aflejre sig i et fast Lag paa Bunden. I disse Tilfælde tappes Vædsken ud gjennem Røret *b*, Fig. 2. At man, medens dette sker, maa sørge for at sterilisere den Luft, som gjennem det krumbøjede Rør trænger ind, forstaas af sig selv.

Naar Karret med den foran omtalte Hektoliter Urt er kommen i kraftig Gjæring, og de første Tegn til Krølledannelse have vist sig, kan hele Indholdet sættes til 3 à 4 Hektoliter Urt. Paa denne Maade gaar den lille Portion hurtig ind i den normale Drift. Hvis man vil, kan man dog ogsaa strax lade hver Gjæring gaa til Ende paa sædvanlig Vis og først ved Hovedgjæringens Slutning tage den dannede Bundgjær. Denne vejes og sættes derpaa til en efter sin Vægt passende Mængde Urt. Om en saadan Renkultur er det at bemærke, at den i de første Gjærkar ofte, omend langt fra altid, attenuerer lidt stærkere end senere og ligeledes i Begyndelsen giver en mindre god Klaring. Herved er mangen Brygger bleven forskrækket uden Grund.

Det er denne Fremgangsmaade, hvorefter der i Bryggerierne hidtil i Almindelighed er blevet arbejdet med mine rendyrkede Gjærarter; den anvendes endnu talrige Steder i Ind- og Udlandet og har gjort og gjør fremdeles god Nytte.

Rendyrkningsapparatet.

Ovenfor blev det berørt, at nogle Ølgjærarter ere mindre modstandsdygtige overfor Konkurrenterne end andre, og som Exempel herpaa nævnede jeg Carlsberg Undergjær Nr. 2. Naar man arbejder med Arter som denne, er Faren for, at Sygdomskim kunne faa Overhaand, forholdsvis stor. Det har derfor under disse Omstændigheder en særlig Betydning at lade saa store Mængder absolut ren Gjær og med saa korte Mellemrum som muligt passere gjennem Gjæringskjælderen for paa denne Maade hurtigt at fortrænge den ældre, urene Gjær. Efter min gamle, ovenfor beskrevne Fremgangsmaade var det allerede et temmelig stort Arbejde to Gange om Maaneden at bringe Bryggeriet ren Paasætningsgjær til 1 Hektoliter Urt, og da dette dog ikke for alle Arters Vedkommende giver fuldkommen Sikkerhed, saa opstod naturligt Ønsket hos mig om at gaa endnu videre. I den Anledning henvendte jeg mig til Hr. Kapt. Kühle, Direktør for Bryggeriet Gl. Carlsberg, og i 1885 begyndte vi da i Forening at arbejde hen til at faa et Apparat opstillet i selve Gjæringskjælderen

til en kontinuerlig Masse-Produktion af absolut ren Gjær. Efter nogle Forsøg blev dette ogsaa opnaaet; Æren herfor tilkommer hovedsagelig Kapt. Kühle. En kort Meddelelse herom gav jeg ved den østerrigske Bryggerforenings Generalforsamling i Graz 12 Juni 1887.

Under Udarbejdelsen af efterfølgende Meddelelser har jeg havt det Maal for Øje, at de skulle kunne forstaas af enhver eftertænksom Læser og ikke paa noget Punkt stille Krav til specielle Forkundskaber. Endvidere har jeg ønsket at give saa nøjagtige og saa udførlige Oplysninger, at den forstandige Praktiker heri skal kunne finde ethvert rimeligt Spørgsmaal besvaret, saa at han uden Tidsspilde og Pengetab skal kunne opstille Apparatet og arbejde dermed. Den, der vil frembringe et Værk, som skal gjøre Nytte i Praxis, tør ikke indskrænke sig til de store Omrids, men maa ogsaa udarbejde Enkelthederne; meget, som i theoretisk Henseende kan se smaat ud, har netop ved en saadan Lejlighed en særlig Betydning. I Overensstemmelse hermed er ogsaa Alt, hvad her meddeles, nøje prøvet i flere forskjellige Bryggerier og Resultatet af henved tre Aars Erfaring.

I den efterfølgende Beskrivelse fremstilles først den Form af Apparatet, i hvilken hverken Gjærings- eller Urtcylinderen har Envelopper; men førstnævnte er beklædt med et isolerende Materiale, f. Ex. Trælister. I denne Skikkelse er det bestemt til at opstilles i Gjæringskjælderen selv. Derefter følger Beskrivelsen af den Form, det skal have, naar det opstilles i et overjordisk Rum eller overhovedet under Forhold, hvor det bliver nødvendigt at regulere Gjæringscylinderens Varmegrad. Tilsidst gives en Anvisning til at benytte det.

Som Fig. 4 viser, bestaar det af tre Hoveddele og de disse forbindende Ledninger, nemlig: 1) Afdelingen for Luftningen, bestaaende af Luftpumpen (*A*) og Luftbeholderen (*B*), 2) Gjæringscylinderen (*C*), og 3) Urtcylinderen (*D*).

Pumpen (*A*) drives med Maskinkraft og optager Luften igjennem et Forfilter, for at en foreløbig Rensning kan finde Sted. Luftbeholderen (*B*) er forsynet med et Manometer og med en Sikkerhedsventil. Den fyldes med Luft indtil en Spænding af 1—4 Atm. Ledningsrørene maa paa passende Steder forsynes med Haner til Udtapning af det Vand, som kan samles i dem; særlig vigtigt er det, at dette sker i Ledningen mellem Luftbeholderen (*B*) og Filtrene (*g* og *m*). Disse forbindes med Luftledningsrørene helst ved Hjælp af Metalrør; hvis man vil anvende Kautschukslanger hertil, maa de være meget stærke for at kunne

udholde Trykket. Anvendes Metalrør, skulle de naturligvis have nogen Spændighed og overhovedet være indrettede saaledes, at Filtrene med tilstrækkelig Lethed kunne anbringes i deres Stilling og atter fjernes[1]).

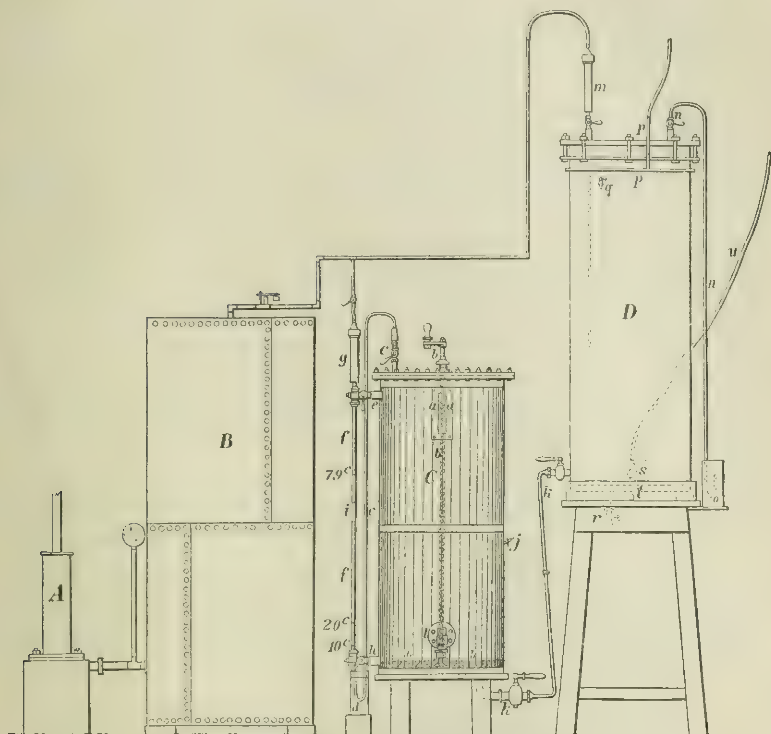


Fig. 4.

Paa Siden af Gjæringscylinderen (*C*) findes to skraas for hinanden stillede Vinduer (*a*). Jeg har taget disse Vinduer med, fordi enkelte Praktikere synes at sætte Pris derpaa; min egen Erfaring viser imidlertid, at de helst bør udelades. Igjennem det

---

[1]) Der blev intet Patent taget paa Apparatet, og det staar saaledes Enhver frit at lave det. Kapt. Kühle og jeg anbefale imidlertid dem, som ønske at benytte det, at tage de to Cylindere fra Hr. Kobbersmed W. E. Jensen i Kjøbenhavn, da dette Etablissement er nøje kjendt med den hele Konstruktion og leverer et godt Arbejde.

Paa Grund af, at Kobberet er steget med c. 90 $^0/_0$, har Hr. Jensen i Januar 1888 maattet forhøje sine gamle Priser:

nøjagtigt paaskruede Laag gaar et Røreapparat (*b*), som forneden ender med to Blade, hvoraf det ene fører et Kautschukblad, hvilket er saaledes tilskaaret, at saavel Bunden som Væggen af Cylinderen berøres deraf, naar en Omdrejning finder Sted. Den inde i Cylinderen værende Del af Røreapparatet er gjengivet ved en mørkere Tone. Fra Laaget udspringer det dobbelt bøjede Rør (*c*), som, naar dets Hane aabnes, sættes i Forbindelse med Cylinderens Indre; dets frie Del er neddykket i et Kar med Vand (*d*). Dette Rør kan anbringes til den Side af Cylinderen, hvor det for Opstillingen i Fabrikken er bekvemmest. Der maa naturligvis under alle Omstændigheder sørges for, at Vandet ikke skal kunne sprøjte ned i det Kar, som under den senere beskrevne Udtapning stilles under Hanen (*l*). Lidt nedenunder Laaget udspringer et vandret Rør (*e*); herved kan Cylinderens Indre træde i Forbindelse med det lodret stillede Glasrør (*f*). Dette er opadtil forbundet med Filtret (*g*) og nedadtil med et andet vandret Rør (*h*), der er indrettet som det først omtalte. For at styrke Glasrøret er der paa dets Midte indskudt et Kautschukled (*i*); man kan ogsaa have Glasrøret i eet Stykke og da indskyde Kautschukleddet (*i*) foroven.

Det øverste Mærke paa Glasrøret betegner en Afstand af 79 Centim. fra Cylinderens Bund, det næste af 20 og det derefter følgende nederste Mærke af 10 Centim. Naar Cylinderen fyldes til øverste Mærke, har den modtaget c. 170 Liter. Glasrøret er forbundet med Vandstandshanerne (*e* og *h*) ved en Pakning af

---

Urtcylinderen med Vandkappe og Brusering, fuldstændig udstyret (Fig. 6, *D*)	700 Kr.
Urtcylinderen som foregaaende, men i Stedet for Vandkappen kun en Spildevandsbakke .	500 Kr.
Gjæringscylinderen med Vandkappe, fuldstændig udstyret (Fig. 6, *C*)	750 Kr.
Gjæringscylinderen som foregaaende, men uden Vandkappe	550 Kr.

Disse Cylindere ere i alle Tilfælde forsynede med Laag af den i Fig. 6 angivne Konstruktion og lavede af fortinnet Kobber med forøvigt forniklet Metalarbejde.

De af Hr. Jensen forfærdigede Cylindere forhandles og opstilles ligeledes af Hr. F. W. Pest's Etablissement, Bergstr. 8 i Berlin.

Luftpumpen og Luftbeholderen kunne erholdes overalt. En passende Luftpumpe faas for c. 400 Kr., en Luftbeholder med 25 Kubikfod Rumfang og prøvet ved 5 Atm. koster c. 500 Kr.

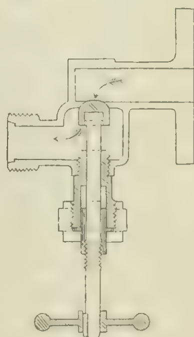
Forespørgsler om Apparatet anmodes man om direkte at rette til den Fabrikant, man ønsker at benytte.

Hamp eller Bomuld med Vaseline; Kautschuk er uheldig hertil, fordi det ved Dampningen bliver haardt.

Filtret (*g*) bestaar af en Metalkapsel, der indeslutter en fastpakket Søjle af Bomuld, 22 Centim. lang og 3 Centim. i Diameter. Der anbringes mindst 35 Gram Bomuld, om man lægger nogle Gram til faar ingen Betydning. Ved at presse Massen tæt sammen, kan der optages 50 Gram og derover, men saa meget behøves ikke. Filtret lukkes foroven ved Hjælp af et paaskruet Laag, der atter er sat i Forbindelse med Ledningen fra Luftbeholderen. Forinden det skrues paa, steriliseres det ved 2 Timers Opvarmning i en Varmekasse med c. 150° C. Om Filtreringen tales forøvrigt i det Følgende.

Paa Cylinderens modsatte Side ses et lille, næppe 1½ Centimeter langt Rør (*j*), hvorpaa der er fastgjort en Kautschukslange, der atter er lukket med en Klemme og med en Glasprop. Fra Cylinderens Bund gaar et Rør (*k*), hvorved Forbindelsen med Urtcylinderen (*D*) tilvejebringes; dette Rør er for Bevægelighedens Skyld sat sammen af to Stykker, og foruden de to afbildede store Haner har det tillige et Par mindre, hvilke under den senere beskrevne Dampning kunne anvendes dels til at udtappe fortættet Damp, dels til Indledningen af de spændte Vanddampe.

Den i Tegningens Midtlinie forneden afbildede Hane (*l*) er til Udtapning af Øl og Gjær. Konstruktionen deraf ses i Fig. 5. Pilene angive den Retning, i hvilken Vædsken strømmer, naar en Aabning finder Sted; Kegleventilen skrues da nedad og, naar der skal lukkes, opad. Den er afbildet i lukket Tilstand. Som Konstruktionen er, forhindres en Infektion udenfra under Tapningen, idet nemlig Cylinderens egen Vædske selv renser Hanen. Denne Hanes Rør fortsætter sig indenfor Cylinderens Væg og bøjer sig nedad mod Bunden; dens Munding befinder sig i 3½ Centimeters Afstand fra denne (Se Fig. 6, *C*, *l*). Den er kort sagt indrettet saaledes, at der under Udtapningen ikke kan trænge Luft udenfra ind i Cylinderen.


Fig. 5.

Naar denne stilles op i selve Gjæringskjælderen, kan den, som foran bemærket, beklædes med Trælister; disse ere antydede i Fig. 4, *C*. Om Cylinderen med Envelop se næste Side.

Urtcylinderen (*D*) maa, som Figuren viser, være stillet højere end Gjæringscylinderen; den er ogsaa selv højere end denne;

dens Diameter er derimod den samme. Da den skal renses hyppigere end Gjæringscylinderen, er dens Laag indrettet til at aftages med større Lethed. Det bærer et Filter (*m*) af samme Beskaffenhed som *g*, og som fortsættes ned i Cylinderen med et Rør (vist med punkterede Linier), hvilket i sin nederste lukkede Ende er forsynet med nogle Smaahuller, hvorigjennem den fra Filtret kommende Luft kan strømme ud. Det dobbeltbøjede Rør (*n*) svarer til *c* paa den anden Cylinder og har ligesom dette sit Kar med Vand (*o*). For Urtcylinderens Vedkommende er det vigtigt, at Aabningen i Røret (*n*) og i den tilsvarende Hane ikke er saa ringe, at Humleblade eller sligt kan fremkalde en Tilstoppelse; passende er $1^1/_3$ Centim. Diameter i Røraabningen. Foroven er denne Cylinder i en temmelig ringe Afstand fra Laaget omgiven af et ringformigt Rør (*p*), hvis indadvendte Del er forsynet med Smaahuller; det er lukket i den ene Ende, og dets anden Ende sat i aaben Forbindelse med en Koldtvandsledning. Foruden Hanerne paa Forbindelsesrøret (*k*) mellem de to Cylindere har Urtcylinderen endvidere tre andre (*q*, *r*, *s*). Hanen (*s*) staar i Forbindelse med Urtledningen (*u*), som udmunder i den Hovedledning, der findes mellem Svalebakkerne og Bryggeriets Urt-Kogekjedel. Cylinderen staar i en Bakke, som er forsynet med et Udløb (*t*) for det Vand, der under Nedsvalingen strømmer nedad Cylinderens Sider. De punkterede Linier i *t* angive dels nogle Bøjler, hvorpaa Cylinderen hviler, dels dennes nederste ringformede Parti og dens derover værende Bund.

Da Apparatet ved Nytaarstid 1886 blev opstillet paa Ny-Carlsberg, maatte Gjæringscylinderen, fordi den skulde have sin Plads i et Værelse over Jorden, hvor den var udsat for kjendelige Temperatursvingninger og navnlig om Sommeren for en for høj Varmegrad, underkastes nogle Modifikationer; disse bleve paa en smuk og praktisk Maade gjennemførte af Hr. Overinspektør Henningsen.

Hovedopgaven var at indrette Gjæringscylinderen saaledes, at man kunde beherske Temperaturen af den deri værende Vædske og navnlig være i Stand til at foretage en Nedsvaling. Hertil tjener Enveloppen, som er afbildet i Fig. 6, *C*. Den gaar ikke blot højt op ad Cylinderens Sider, men tillige under dens Bund, og for Rensningens Skyld har den en løs Bund, som med temmelig Lethed kan skrues fra. I dette Tilfælde maa man have en poseformig Indsænkning gjennem Kappen ind i Cylinderen selv til Anbringelse af et Thermometer. Vinduerne falde nu selvfølgelig bort. Enveloppen har en Hane forneden til Indførelse af Svalevandet og paa den modsatte Side foroven et Udløbsrør; en tredie Hane for-

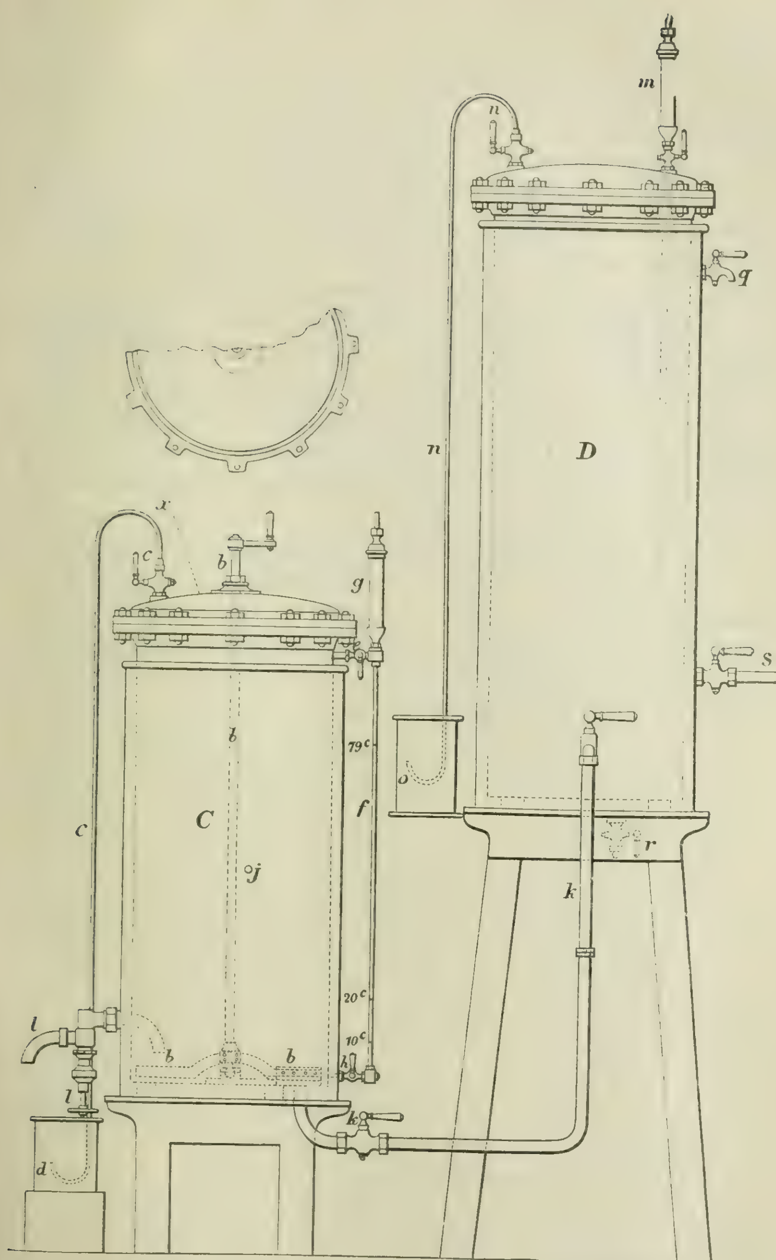


Fig. 6.

neden skal navnlig tjene til Udrensning af det Bundfald, som Vandet efterhaanden afsætter.

Urtcylinderen (Fig. 6, *D*) har ogsaa faaet sin Kappe, men den kan godt undværes, da Svaleringen (Fig. 4, *p*) gjør fuldkommen Fyldest. Det er imidlertid behageligere at arbejde med Kappen, idet den nemlig danner en Skjerm omkring det fra Ringen nedstrømmende Svalevand, saa man ikke bliver oversprøjtet deraf. En Cylinder med Kappe er til Gjengjæld betydelig kostbarere og mindre let at flytte.

Fig. 6, *C*, *x* viser os tillige en bedre, men derfor ogsaa kostbarere Konstruktion af Laaget end den i Fig. 4 fremstillede. Midtstykket er af Kobber og er forsynet med en paaloddet Messingflanche, der springer frem med 12 Lapper; igjennem disse gaa Bolte, som ere forsynede med Møttriker. Mellem Laaget og Cylinderens Krave anbringes i en dertil indrettet Fure en passende Kautschukring. Man er herved i Stand til at forbinde Laaget fuldstændig lufttæt med Cylinderen.

De i omstaaende Fig. 6 anbragte Bogstaver have forøvrigt samme Betydning som i Fig. 4, og Forklaringen dertil findes altsaa p. 282—286.

Røreapparatets Indretning (*b*) ses tydeligere i Fig. 6 end i Fig. 4. For at det ikke under Brugen skal komme ud af sit Tapleje paa Cylinderens Bund, er dette et Kugleleje. Stangen ender, som Fig. 7 viser, i en Kugle, der hviler i en halvkugleformig Fordybning i det faste Underlag. Ved Hjælp af to Bolte fastgjøres to Stykker, som nøjagtig passe til Kuglen; Stangen kan da vel drejes rundt, men ikke komme ud af sit Leje.

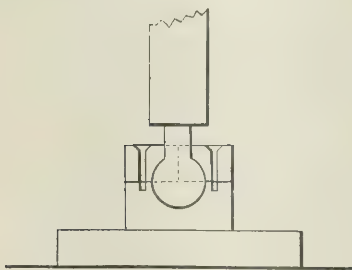


Fig. 7.

Et opmærksomt Blik paa vort Apparat viser, at det er bygget efter de samme Principer som de Kolber, der i Laboratorierne anvendes til Experimenter med Mikroorganismer, og at Pasteurs tohalsede Kolbe navnlig har tjent som Forbillede.

Naar man opstiller det, maa man først og fremmest have for Øje, at det kan staa i Fred. Hvis det lader sig gjøre, vil det vistnok i Almindelighed, som det er sket paa Gl. Carlsberg, være mest praktisk at anbringe det i Gjærkjælderen selv. Man har da

i Reglen ingen Ulejlighed med at regulere Temperaturen, og det tager forholdsvis mindre Tid at passe det, idet Folkene i Mellemtiden kunne udføre andet Arbejde i Nærheden. Er Gjærkjælderens Temperatur under 6° C., vil det være tilraadeligt at anbringe en Vandkappe om Gjæringscylinderen. Ved Opstillingen maa man naturligvis fra Begyndelsen tage Hensyn til, om man agter at anvende een eller flere Gjæringscylindere; under alle Omstændigheder er der kun Brug for een Urtcylinder.

Det første, man har at gjøre, naar Apparatet er opstillet, er at prøve, om Cylinderne ere tætte. Dette sker ved forsigtigt at indlede Damp gjennem Ledningen (*k*) og derefter lukke for de øvrige Haner. At man bestandig maa arbejde med en vis Forsigtighed, navnlig i Begyndelsen, følger af sig selv. En Hovedbetingelse er det, at den, der skal benytte Apparatet, i Forvejen nøje gjør sig bekjendt med dets Indretning og Anvendelse. De første Prøver bør helst gjøres med Vand. En Regel er det, at kun een Mand bør lede det Hele. Erfaringen har vist mig, at man i Begyndelsen navnlig ofte glemte dette, men naar Flere kommandere, gaar det galt.

Naar Apparatet skal sættes i Gang, maa man foretage en fuldstændig Sterilisation af de to Cylindere, af den disse forbindende Ledning og af Ledningen, gjennem hvilken Urten tilføres Urtcylinderen. Dette sker ved en stærk Gjennemdampning; Filtrene steriliseres, som det erindres, i en Varmekasse.

Sterilisationen af Gjæringscylinderen sker derved, at Dampledningen sættes i Forbindelse med en af Hanerne paa Ledningen (*k*) (Bogstaverne henvise til Fig. 4 og 6), og medens de stærkt spændte Vanddampe trænge ind, aabnes af og til de forskjellige Haner, saa at Udstrømningen ikke blot foregaar gjennem det dobbelt bøjede Rør (*c*), men tillige gjennem disse. Dette vedvarer ½ Time. Kort forinden anbringes Filtret, og derpaa lukkes alle Haner undtagen den, der hører til det dobbelt bøjede Rør, og samtidig aabnes for Luften, der nu gjennem Filtret (*g*) og Ledningen (*h*) strømmer ind i Cylinderen. Denne afkøles dels herved og dels derved, at man lidt efter lidt formindsker Damptilførselen. Afkølingen foretages kort sagt saaledes, at der stadig bobler Luft blandet med Damp gjennem det dobbelt bøjede Rør (*c*). Saalænge der gjennem dette gaar tydelige Dampstrømme, og man altsaa derved let kan iagttage, ad hvilken Vej Luftbevægelsen finder Sted, behøver man ikke Vandkarret (*d*); det er først paa et lidt senere Stadium, at det er nødvendigt som Indikator. Lukkede man pludselig af for Dampen, kunde der være Fare for, at Filtret ikke formaaede at tilføre den Luftmængde, som vilde

være fornøden for at forhindre, at der ved Afkølingen skulde opstaa et luftfortyndet Rum, og i saa Fald vilde Følgen blive, enten at Cylinderen kom til at indsuge uren Luft eller, at den ved Luftens Tryk udvendig fra blev klemt sammen. Afkølingen tager under disse Forhold ved almindelig Gjærkjælder-Temperatur c. 2 Timer.

Angaaende Vandafspærringen ved de dobbelt bøjede Rør (*d* og *o*) kan her en Gang for alle bemærkes, at dens Betydning kun er den at give tilkjende, i hvilken Retning, Luftbevægelsen foregaar.

Urtcylinderen og dens to Ledninger (*s*, *u* og *k*) underkastes en lignende Sterilisation, Afkølingsprocessen falder imidlertid her bort. Naar man omtrent er færdig med Dampningen, aabner man for den filtrerte Luft og leder Urten ind. Den Urt, der benyttes, er almindelig humlet Urt til Lagerøl; den er bleven steriliseret ved Kogningen i Bryggeriet og føres i saa varm Tilstand som muligt gjennem Ledningen (*u*) og dennes Hane (*s*) ind i Cylinderen. (I Fig. 4 er Ledningen (*u*) angiven, i Fig. 6 derimod ikke; den maa i sidstnævnte Afbildning tænkes som en Fortsættelse af Hanen, *s*). Kort forinden man er færdig med Dampningen, begynder man at pumpe den kogende Urt ud paa Bakkerne, og 10 Minutter derefter aabner man for Hanen (*s*). Man lader Urten strømme ned, indtil den har naaet den øverste Hane (*q*), hvorpaa Hanen (*s*) lukkes. Det kan anbefales at hænge en lille Spand under Hanen (*q*) til at opfange Urten fra denne. Naar Urten begynder at strømme ned deri, ved man, at man har erholdt det ønskede Maal. De i Cylinderen værende hede Dampe og den tilstedeværende Luft uddrives dels gjennem *q*, dels gjennem det dobbelt bøjede Rør (*n*). Det kan være rigtigt, gjennem den nederste Hane (*r*) at udtappe den første lille Portion Urt, som kommer ind, da den nemlig i høj Grad bliver blandet med fortættet Vanddamp og herved erholder en ilde Smag.

Naar den ønskede Urtmængde er kommen ind i Cylinderen, lukkes Hanerne (*q* og *s*). Gjennem Filtret lader man nu den sterile Luft strømme ind i den varme Urt i Løbet af en Timestid, forinden man begynder den egentlige Nedsvaling, men ogsaa under denne fortsætter man hele Tiden Luftningen. I Almindelighed vil det være tilstrækkeligt, naar der er et Tryk af 1—2 Atm. i Luftbeholderen. Der ønskes kun, at der i Cylinderen bestandig skal være et ringe Overtryk af steril Luft. Herved opnaar man Sikkerhed for, at ingen Indsugning af uren Luft kan finde Sted, og at Urten optager en passende Mængde Ilt. Det er en Selvfølge, at man ikke, som det en Gang skete i et Bryggeri, maa glemme i

Forvejen at aabne for Hanen ved *n*; en Sprængning vil ellers kunne finde Sted.

Naar den egentlige Nedsvaling skal begynde, sættes Svaleringen (*p*) i Forbindelse med en Vandledning. Man overrisler saaledes Cylinderens Sider, indtil Urtens Temperatur derved er bragt ned til henved 10⁰ C., hvilket i en almindelig Gjærkjælder plejer at tage 1 Time. Den øvrige Nedsvaling maa foretages ved Hjælp af Isvand.

Luften har imidlertid uafbrudt boblet gjennem Vædsken og ud af det dobbelt bøjede Rør og herigjennem tillige fort en Del Urt med sig; der vælter nemlig en ret betydelig Mængde Skum frem, hvilket dog har vist sig ikke at give Anlednig til Infektion. En altfor voldsom Luftning bør undgaas, for at der ikke skal tabes en saa stor Mængde Urt, at den tilbageblevne Rest ikke kan forslaa.

Det er først, efterat Urten er svalet ned til c. 11⁰ C., at Skummet gaar gjennem Røret. Mindre generes man deraf, naar man i Karret (*o*) anbringer varmt Vand.

Den saaledes til Gjæringen forberedte Urt bringes derpaa ned i Gjæringscylinderen gjennem Ledningen (*k*).

For at undgaa at bringe Uro i Vædsken, medens den strømmer over i Gjæringscylinderen, kunde man sætte Filtret (*m*) i Forbindelse med et togrenet Rør, hvis ene Gren fortsættes af det foran beskrevne Luftningsrør, medens den anden kun gjennemborer Cylinderens Laag, altsaa uden at komme i Berøring med Vædsken; ved Haner maatte da enhver af disse to Grene kunne aabnes og lukkes for Luftstrømmen. Den under Urtens Udtapning nødvendige Lufttilførsel skulde i saa Fald naturligvis udelukkende finde Sted gjennem den sidstnævnte Gren. Nogen væsentlig Betydning har denne Ændring i hvert Fald ikke; den findes paa nogle af de af Hr. W. E. Jensen forfærdigede Cylindre, paa andre derimod ikke.

Ønsker man, at Urten først skal afsætte en større Del af sit Bundfald, kan man lade den staa en Timestid. For at sikre sig mod Indsugning tør man dog ikke fuldstændig lukke for Filtret, men indskrænker blot Luftstrømmen. Dette Bundfald gjør forøvrigt ingen Skade i Gjæringscylinderen, og man kan derfor godt føre Urten over, saasnart den er afsvalet. Til den Tid vil der ogsaa være afsat et ret betydeligt Bundfald, og da Mundingen af Ledningen (*k*) er anbragt i en temmelig Afstand over Urtcylinderens Bund, vil kun en ringe Del af dette Bundfald blive ført med.

Den første Tilførsel af Urt maa ikke naa højere op end til Udspringsstedet af det lille Rør (*j*); herigjennem tilsættes nemlig Gjæren. Denne har man samlet i nogle store tohalsede Glas-

kolber, og man arbejder ved Hjælp af en Spirituslampe, forsaavidt en Gaslampe ikke findes. Om Gjærens Tilberedning og Anbringelse i Cylinderen se forøvrigt p. 298.

Røreapparatet sættes derpaa i Gang, for at Gjæren kan blive godt sammenblandet med Urten, og naar dette er sket, tilsættes den endnu manglende Del af denne, idet man nemlig fylder op til det øverste Mærke paa Glasrøret (*f*), c. 170 Liter. Den i dette staaende Vædskesøjle føres ved Lufttryk fra Filtret ind i Cylinderen, idet man forinden lukker for Hanen paa det øverste vandrette Rør (*e*) og aabner for Hanen paa Røret (*h*). Hvis man ikke under Gjæringen vil fortsætte Luftningen, lukkes naturligvis ogsaa paa sidstnævnte Sted, dog først, efterat man i Forvejen har lukket for Ledningsrøret til Filtret.

Efter en halv Snes Døgn kan den ønskede Del af den nyavlede Gjær udtages. Ved denne Angivelse har jeg tænkt mig, at Cylinderen er udsat for almindelig Gjærkjældertemperatur; er Varmegraden derimod højere, vil man naturligvis efter kortere Tids Forløb kunne tage Gjæren. Gjennem Hanen (*l*) tapper man Øllet ud, og naar der begynder at løbe Skum med ud, lukkes der. Fra Urt-Cylinderen, hvis Vædske paa den Tid maa være færdig til den nye Gjæring, overføres derpaa saa meget, at det naar op til næstnederste Mærke paa Glasrøret (*f*). Med Røreapparatet røres Gjæren godt op, og denne Blanding af Gjær og Urt tappes derpaa ud i et fuldstændig rent Kar (vel renset med Vand og derefter gjennemdampet eller vasket med en spirituøs Opløsning af Salicylsyre). Man standser med denne Udtapning, naar Vædsken er sunken til det nederste Mærke paa Glasrøret, hvorpaa der atter fyldes op med Urt til det næstnederste, og efter en passende Omrøring udtappes paany tyndflydende Gjær i Karret, indtil det nederste Mærke er naaet; man har da udtaget ialt c. 50 Liter. Den tilbageblevne Rest er tilstrækkelig til at frembringe en lignende Avl som den foregaaende.

Det er hensigtsmæssigt at have to Mærker afsat i det Kar, hvori Gjærblandingen udtappes, saaledes at det ene betegner 25, det andet 50 Liter; om nogen stor Nøjagtighed er der her slet ikke Tale.

Med den udtappede Gjær, som giver Paasætningsgjær til 8 Hektoliter Urt, bringes saa snart som muligt en ny Gjæring i Gang i et vel renset almindeligt Kar. Kan det ikke ske strax, bør man dække Gjærkarret og stille det hen paa et koldt og renligt Sted.

Under Udtapningen saavel af Urten som af Øllet fra de to Cylindere maa man selvfølgelig nøje sørge for, at en passende

Luftmængde uafbrudt kan strømme gjennem Filtrene. Vedkommende Vædske vilde ellers vanskelig kunne løbe ud, og en Indsugning udenfra kunne finde Sted. Saasnart Udtapningen af Gjæringscylinderen er færdig, fyldes op med Urt til det øverste Mærke paa Glasrøret; der røres op, og den nye Avl er hermed sat i Gang.

Mundingerne af de to Haner (*l* og *k*) renses strax nøjagtig for den Øl- og Urtvædske, som findes deri; i modsat Fald vilde der nemlig udvikle sig en Vegetation af Bakterier, Gjær- og Skimmelsvampe. Man kan hertil passende anvende Dampslangen, idet man paa den befæster et rørformet Mundstykke, og derefter benytter den paa samme Maade som en Sprøjteslange. Det varme Vand, som først kommer frem i Slangen, naar man aabner for Dampen, benyttes til Udskylningen; Steriliseringen udføres med de derefter følgende spændte Dampe. Naar dette er sket, lukkes vedkommende Mundinger, idet man skruer Metallaag derpaa.

Under Gjæringen vil den dannede Kulsyre forhindre, at en Indsugning indtræder, og man behøver altsaa af den Grund ikke at lufte; Gjæringen og Celledannelsen finde tilmed ogsaa Sted paa passende Maade, uden at der luftes. Ønsker man imidlertid for at indvirke paa Gjæringens Gang at anvende en Luftning, vil der i Reglen kun være Tale om at lade ringe Luftmængder passere gjennem Vædsken. Disses Tilstrømning reguleres da saaledes ved Hanen ovenover Filtret, at der med et Par Minuters Mellemrum bobler lidt Luft ud af det dobbelt bøjede Rør og op gjennem Vandet (*d*). Under disse Forhold vil man ogsaa ved at lægge Øret til Cylinderen kunne høre en ganske langsom, stødvis Boblen gjennem Urten. Har Cylinderen en Envelop, maa man nøjes med at iagttage den i Vandet. At man ogsaa kan lufte ovenover den gjærende Urt gjennem Røret (*e*), er selvfølgeligt.

Om Luftningens Indflydelse formaa vi desværre endnu ikke at opstille almengyldige Regler for Praxis.

Ved Hjælp af de p. 283 omtalte Vinduer (*a*) sættes man i Stand til at se ind i Gjæringscylinderen og at betragte Vædskens Overflade. Det er imidlertid ikke megen Oplysning, man paa den Maade kan erholde, og da disse Vinduer under Dampningen let springe itu og overhovedet frembyde en Kilde til Utæthed, bør de helst udelades. Apparatets Indretning tillader forøvrigt med Lethed at erholde Prøver til Kontrol; større Prøver udtages gjennem Hanen (*l*), smaa gjennem Røret (*j*). Erfaringen vil dog hurtigt lære, hvorledes Gjæringen paa det givne Sted gaar, og man kan da altid uden foregaaende Undersøgelse nogenlunde vide, naar Tidspunktet er kommet til at tage Gjæren. Her maa tilmed erindres,

at Opgaven kun er at avle Paasætningsgjær og ikke at producere Øl af en bestemt Beskaffenhed. At Øllet ikke spildes, men føres i Lagerkjælderen med Bryggeriets øvrige Øl, følger af sig selv.

Ved Apparatets Anvendelse er der to Hovedpunkter at mærke: 1) at Gjennemdampningen er tilstrækkelig, saa at en virkelig Sterilisation opnaas, og 2) at der under Afkølingen og Udtapningen bestandig findes et Overtryk af steril Luft i vedkommende Cylinder. Naar disse to Hovedbetingelser ere opfyldte, kan ingen Infektion, ingen Indsugning af uren Luft finde Sted. At der forøvrigt maa arbejdes med Omhu, kan ikke tilstrækkelig indskærpes. Følges den her givne Anvisning nøjagtigt og med Forstaaelse, ville Vanskeligheder ikke indtræde. I de Aar, i hvilke Apparatet har været i Gang i Gl. Carlsbergs Gjæringskjælder, blev det til forskjellig Tid underkastet en skarp Kontrol, men bestandig viste det sig, at Alt var i Orden.

Om Filtrene.

Hurtigere og lettere vilde man komme til Maalet, hvis det lod sig gjøre at tage den paa Svalebakkerne færdigt afkølede og iltede Urt og ved Filtrering befri den for de Mikroorganismer, der altid findes deri; Urtcylinderen vilde da falde bort, og hele Fremgangsmaaden blive simplere. De Forsøg, som i den Retning bleve anstillede, gave imidlertid intet tilfredsstillende Resultat.

Til Filtre, som skulde kunne anvendes hertil, maa man ikke blot stille den Fordring, at de give en absolut kimfri Vædske, men tillige, at de i en given Tid ikke lade for smaa Vædskemængder trænge igjennem, og endelig at Vædskens Sammensætning ved Filtreringen ikke i væsentlig Grad forandres. Det Filter, som i disse Henseender ifølge de foreliggende Beretninger yder det Meste, er Chamberlands, og det blev derfor ogsaa valgt, nemlig den nye Model, som kom i Handelen i 1886. Forsøgene bleve efter min Anvisning anstillede af Hr. Assistent Poulsen. De Resultater, han erholdt, vare følgende:

Et Filter, bestaaende af 5 Rør, gav i $2^1/_2$ Time 10 Liter Siposeurt (13,5 % Ball.), naar der anvendtes en Sugning af $^6/_7$ Atm., og naar Rørene bleve godt rensede udvendig ved Børstning hvert 10de Minut. For i den angivne Tid at erholde 1 Hektoliter, maatte man altsaa have 50 Rør. Rensningen vilde under disse Forhold blive temmelig vanskelig, og det vilde tillige let kunne ske,

at et eller andet af de mange skrobelige Ror kunde faa Stød, saa at de fik større eller mindre Revner. I saa Fald vilde man kunne blive narret, idet Gjæringscylinderen da modtog en inficeret Urt. Den væsentligste Mangel er imidlertid den, at Urten ved Filtreringen mistede Halvdelen af den Iltmængde, som ved Luftningen paa Svalebakkerne var optagen deri, og som er nødvendig for den normale Gjæring.

Som en Følge heraf vil det ikke være fordelagtigt at benytte Filtrering til at sterilisere Urten til Gjæringscylinderen. Ved disse Forsøg fik jeg imidlertid Øje for, hvor fortrinligt Chamberlands Filter er til at fremstille forskjellige sterile Næringsvædsker, hvorfor der ofte er Brug i et gjæringsfysiologisk Laboratorium. Vil man sikre sig et fulstændig kimfrit Filtrat, maa man dog med korte Mellemrum sterilisere Rørene. De kunne ikke, som man i Begyndelsen var tilbøjelig til at antage, fungere saa længe det skal være; efter kortere eller længere Tids Forløb gaar der nemlig Bakterier igjennem dem.

Vi have i det Foregaaende altsaa erfaret, at Chamberlands Filtre give sterile Vædsker; det er da ogsaa en Selvfølge, at de kunne give steril Luft. Ligesaa store Vanskeligheder, som Vædskerne i den Retning frembyde, ligesaa let gaar det, naar Talen kun er om Luften; det er en gammel kjendt Sag, og de af Schröder og Dusch i deres berømte Forsøg fra 1854 over Generatio spontanea benyttede simple Bomuldsfiltre have, som bekjendt, ogsaa fundet en stor og forskjelligartet Anvendelse i Praxis.

For at erholde Oplysning om, hvorledes saadanne Filtre af Bomuld til det foran beskrevne Rendyrknings-Apparat paa den mest praktiske Maade kunde indrettes, anmodede jeg Hr. Assistent Poulsen om at anstille en Række Forsøg, hvoraf Resultaterne nedenfor meddeles:

Da det fandtes, at Metalrør som de i Fig. 4 og 6 (*g* og *m*) afbildede have en for den øvrige Opstilling passende Form og Størrelse, bleve Forsøgene anstillede dermed. I disse Rør kan, som det foran er meddelt, optages en Søjle af Bomuld paa 22 Centim. Længde og 3 Centim. Diameter. I den nedadvendte Ende findes et kort Rør med c. $^{3}/_{4}$ Centim. i Diameter. Den anden Ende er aaben og forsynet med udvendige Skruegænger, saa at et Mundstykke, endende i et kort Rør opadtil, kan skrues paa. Bomulden blev stoppet ned i smaa Portioner og sammentrykkedes

med Haandkraft ved Hjælp af en rund Træstang. Inden Mundstykket skruedes paa, blev der indlagt Bomuld i dette for at optage grove Urenligheder. Vigtigt er det at lægge Mærke til, at man ikke maa presse Bomuld ind i Mundstykkets Rør. Det er derigjennem, at Luften ledes ind i Filtret, den modsatte Ende, hvor den forlader dette, blev forinden Sterilisationen lukket med en fastsluttende Bomuldsprop. Saaledes forberedt, steriliseres hele Filtret uden nogen Besvær i en almindelig Varmekasse, 2 Timer ved henved 150° C. Da der ifølge Angivelser af Klein kunde være Tvivl om, hvorvidt et Bomuldsfilter, som det vi benyttede, ogsaa i dets Midte blev steriliseret ved en saadan Opvarmning, bleve de nødvendige Forsøg udførte. Disse viste, at ogsaa Delene i Midten vare sterile. Med et saadant steriliseret Filter bleve Prøverne anstillede paa den Maade, at der førtes betydelige Mængder af uren Luft med Tryk af 3–4 Atm. gjennem Filtret og derfra ind i Kolber med steriliseret Gjærvand, hvilket er en meget gunstig Vædske for Bakterier. Disse Kolber stode derpaa mindst 14 Døgn ved en Temperatur af henved 30° C. For at stille Spørgsmaalet med særligt Hensyn til Skimmel- og Gjærsvampe, blev der ogsaa under de samme Omstændigheder anvendt Kolber med steriliseret Ølurt. I alle Tilfælde bleve Forsøgene udførte saaledes, at Luften, for saa vidt den ved sin Indtrædelse i Vædsken indeholdt Kim, da ogsaa maatte komme til at afgive disse. Desuden blev der ved Filtreringens Slutning hurtigt taget Prøver af Bomulden i Rørets øverste Parti, hvilke derpaa strax og med tilbørlig Forsigtighed anbragtes i Kolber med de foran nævnte sterile Næringsvædsker. Det viste sig da, som man maatte vente, at de sidstnævnte Prøver bestandig indeholdt levende Mikroorganismer. Det Samme var ogsaa Tilfældet med Luften, der havde passeret Filtret, hvis dette var løst stoppet, saa at der i det beskrevne Rør kun fandtes 25 Gram Bomuld eller derunder; var det derimod fastere stoppet, med 35 Gram eller derover, var Luften, som havde passeret derigjennem ogsaa under et stærkt Tryk, bestandig befriet for alle sine Kim, den var bleven fuldstændig steril. Ved at anvende nogen Kraft, kan man med temmelig Lethed presse 50 Gram Bomuld sammen i det ofte omtalte Rør, men saa meget behøves som sagt ikke. I de foran beskrevne Forsøg gik der som Regel 16 Liter Luft gjennem hver Kolbes Vædske.

For Anvendelsen i Praxis har det Betydning at faa det Spørgsmaal afgjort: hvor ofte Filtret maa steriliseres. Det kunde nemlig tænkes, at de i den øverste Ende under Indsugningen fastholdte Mikroorganismer kunde formere sig og, naar Filtret

blev fugtigt, efterhaanden trænge igjennem det, hvorved det følgelig blev ubrugeligt. For at erholde Klarhed herover, lode vi nogle af de i de foregaaende Forsøg benyttede Filtre, hvis øvre Del altsaa indeholdt Mikroorganismer, ligge i Laboratoriet 6 Maaneder. De bleve da paany prøvede og paa lignende Maade som tidligere. Resultatet var, at de bestandig gave steril Luft.

Skarpere Prøver bleve derefter anstillede paa følgende Maade: Den i Filtrets Laag værende Bomuld blev neddyppet i Næringsvædsker, som indeholdt en kraftig Vegetation af Bakterier, Gjærceller og af Penicillium glaucum. Herigjennem førtes Luft med 3 Atm. Tryk i Løbet af 2 Timer. Prøvekolberne vare af samme Art som de foran omtalte. Derpaa blev dette fugtige og stærkt inficerede Filter lagt hen i Laboratoriet i 3 Uger og nu underkastet en lignende Prøve som første Gang. Udfaldet blev i begge Tilfælde det samme: Den Luft, som havde passeret Filtret, var steril, ingen af de i Bomuldssøjlens øverste Del værende Mikroorganismer var bleven reven med. I Overensstemmelse hermed viste det sig, at Bomuld fra Filtrets nederste Del ingen Udvikling fremkaldte hverken i Gjærvand eller i Urt; kraftige Vegetationer fremkom derimod, saasnart disse Prøver toges fra de øverste Lag.

Af disse Analyser følger, at man i Maaneder kan benytte saadanne Bomuldsfiltre uden paany at sterilisere dem; en nøjagtig Tidsangivelse, gjældende for alle Tilfælde, kan ikke gives; her maa Erfaringen paa de enkelte Steder være det Afgjørende; tilraadeligt er det i hvert Fald, en Gang imellem at foretage en Sterilisation. Ogsaa maa det vel erindres, at man, naar Filtret paa Urtcylinderen tages af for at lægges hen, indtil det næste Gang skal bruges igjen, da strax bør forsyne dets nederste Munding med en Prop af steriliseret Bomuld og, forinden det skrues paa, borttage denne og rense Mundingen med en Flamme. Ligeledes kan det anbefales, af og til at skrue Laaget af for at ombytte det øverste urene Bomuldslag med steriliseret Bomuld.

Af de nærmest foregaaende Forsøg maa man ikke drage den urigtige Slutning, at disse Filtre kunne sterilisere Vædsker; at Saadant ikke er Tilfældet, er forøvrigt jo ogsaa allerede berørt. Naar Bomuldssøjlen er helt gjennemtrukken med Vædske, hører dens steriliserende Evne op; derfor er det af Vigtighed, at Ledningsrørene mellem Luftbeholderen og Filtrene ikke indeholde Vand (se Bemærkn. p. 282).

Den sidste Række Forsøg, som Poulsen efter min Anmodning udførte, gik ud paa at bestemme, hvormegen Luft der under for-

skjelligt Tryk i en Time gik gjennem Filtrene. Til at maale Mængden af den gjennemstrømmede Luft anvendtes en fin Gasmaaler. For Sammenlignings Skyld blev Chamberlands Filtrer ogsaa prøvet, nemlig et Lerrør, mærket F. Resultatet ses af hosstaaende Tabel:

I. Chamberland-Filter med 1 Rør.

Trykket	1—1$^1/_4$ Atm.	 20	Kubf.	i 1 Time.
—	$^1/_2$—$^3/_4$ —	 14	—	—
—	c. $^1/_2$ —	. . c. 10	—	—
—	c. $^1/_4$ —	. . c. 5	—	—

II. Bomuldsfiltret med 50 Gram (c. 0,32 Gr. pr. 1^{cc}).

Trykket	3 Atm.	. . . 120	Kubf.	i 1 Time.
—	1 —	. . . 15	—	—
—	$^1/_2$—1 —	. . . 14	—	—
—	$^1/_3$—$^1/_2$ —	. . . 10	—	—
—	c. $^1/_4$ —	. . . c. 7	—	—

III. Bomuldsfiltret med 35 Gram (c. 0,22 Gr. pr. 1^{cc}).

Trykket	$^1/_2$ Atm.	. . . 27	Kubf.	i 1 Time.
—	$^1/_3$ —	. . . 19	—	—
—	$^1/_4$ —	. . c. 12	—	—

Aarsagen til, at der i ovenstaaende Rækker ikke blev bestemt flere Størrelser, er den, at Poulsen kun en kort Tid havde Maaleapparatet til sin Raadighed. De af ham fundne Værdier give i hvert Fald ogsaa en god Forestilling om, hvad de to Slags Filtre i den nævnte Retning kunne præstere. Ved at foretage en Sammenligning ses, at Chamberland-Filtret og Bomuldsfiltret med 50 Gram nogenlunde yde lige meget, men at Bomuldsfiltret med 35 Gram i betydelig Grad overgaar dem begge. Det bemærkes, at Forsøgene bleve udførte aldeles paa samme Maade og med det samme Maaleapparat.

Fremstillingen af Gjæren til Rendyrkningsapparatet og dens Forsendelse.

Gjæren, som kræves til at bringe de c. 170 Liter Urt, der findes i Gjæringscylinderen, i normal Gjæring, avles i de 4 p. 277 omtalte Metalkolber. Efterat man heri paa den beskrevne Maade

har erholdt et saa stort Gjærbundfald som muligt, udtappes alt Øllet. Til hver sættes derpaa $^{1}/_{2}$—$^{2}/_{3}$ Liter steriliseret Vand for dermed at ryste Gjæren løs. Den saaledes stærkt fortyndede Gjær overføres derpaa i steriliserede tohalsede Helliters Glaskolber. Man vil sjelden kunne nøjes med 4, men i Reglen bruge 6 dertil. Disses Indhold overføres endelig i Gjæringscylinderen gjennem Røret (*j*, Fig. 4 og 6). Alle disse Arbejder maa naturligvis udføres saaledes, at Renkulturen bevares.

At overføre Gjæren direkte fra Metalkarrene, lader sig ikke gjøre, naar Indførelses-Røret (*j*, Fig. 4 og 6) findes paa Siden af Cylinderen. Dette Rørs Stilling er imidlertid bestemt af det Hensyn, at det tillige skal kunne tjene til at afgive Prøver i steriliserede Kolber, for at man, naar det ønskes, kan være i Stand til at undersøge, om en Renkultur findes i Apparatet eller ej.

Til at analysere Gjæren og til at fremstille Renkulturen kræves en særegen Indsigt og stor Øvelse, som kun kan erhverves ved i længere Tid at arbejde i et dertil indrettet Laboratorium. Et Hjælpemiddel yde mine forskjellige Skrifter om dette Æmne og navnlig nærværende. Overfor Praktikeren have de den Opgave at gjøre Betydningen af den nye Reform indlysende, saa at han paa en fornuftig Maade kan indføre den i sin Drift; men hvis nærværende Afhandlinger ere skrevne saaledes, som jeg selv ønskede det, da jeg begyndte derpaa, saa ville de tillige vise, at han ikke selv kan magte disse vanskelige Arbejder, men maa søge Hjælp dertil hos Sagkyndige.

Denne er i vor Tid ikke vanskelig at erholde; nogle Bryggerier have selv indrettet Laboratorier, men i Almindelighed benyttes offentlige Anstalter; det Sidste vil vistnok i de fleste Tilfælde være det mest praktiske. Følgende offentlige Laboratorier have optaget mine Methoder i deres Program: A. Jørgensens Laboratorium, Vesterbrogade i Kjøbenhavn, Forsøgsstationerne for Bryggerivæsen i Berlin, Nürnberg, München, Wien og Prag, Wahls og Henius' Laboratorium i Chikago; hertil kan endelig føjes Marx's Laboratorium i Marseille, fra hvilket sidste, skjøndt det ikke er offentligt, dog flere franske Bryggere have faaet Rendyrkninger. Muligvis findes der andre, som jeg ikke kjender; naar de ikke nævnes, maa dette altsaa ikke opfattes som en Mangel paa Hensyn fra min Side. Til disse Anstalter tillader jeg mig at henvise de Etablissementer, som ønske Hjælp i de nævnte Retninger. Carlsberg Laboratoriet har som Forskningsanstalt andre Opgaver og kan ikke beskjæftige sig dermed.

De i Bryggeriet Gl. Carlsberg førte to Gjærarter, Nr. 1 og Nr. 2 faas ligesom tidligere ved direkte Henvendelse til Kapt. Kühle.

Bryggeren maa selv passe Apparatet, og hvis der ikke er et zymoteknisk Laboratorium i Nærheden, maa han ogsaa som Regel selv overføre Gjæren i Gjærcylinderen. Ofte vil han være nødsaget til at forskrive Gjæren langvejs fra; i den Anledning har jeg udarbejdet følgende Fremgangsmaade. Jeg havde herved det Maal for Øje, at Forsendelsen skulde foregaa med den størst mulige Sikkerhed, og at det Hele skulde være simpelt; Bryggeren skulde kun behøve at ryste vedkommende Kolbe med Gjær og derpaa sætte den i Forbindelse med det lille Siderør (*j*) paa Gjæringscylinderen (Fig. 4 og 6), al Gjæren skulde da med Lethed kunne udtømmes i denne. Disse Hensyn bevirkede, at jeg valgte en Glasballon, at jeg gjorde den stærk og temmelig lille og overhovedet saaledes som nedenfor beskrevet:

Der anvendes en Kolbe paa 1½—2 Liter som hosstaaende Fig. 8, af tykt, stærkt Glas og med flad Bund, saa at ingen Brix behøves. I Fig. 9 ses et Længdesnit af det rette Rør; *c* er Glasrøret, hvis Munding er forsynet med en lille Krave; *b* er en tætsluttende Kautschukprop, *a* en derover spændt stærk Kautschukhætte, som ved *d* er gjort fast med Kobbertraad, i Fig. 8, *a* ses denne Overbinding tydelig. Kautschukproppen (*b*, Fig. 9) maa ikke blot lukke nøjagtig, men tillige være indrettet saaledes, at den med temmelig Lethed kan tages ud, naar Hætten (*a*) fjernes. Med Kolbens bøjede Hals (*d*, Fig. 8) er en Kautschukslange (*b*) forbunden, i hvis nedadvendte Munding et Glasrør (*c*) findes. Denne Slange maa være stærk og gjort fast med de to Rør ved Hjælp af Metaltraad; i Nærheden af Mundingen af den bøjede Hals findes en Klemme, som fuldstændig kan lukke Slangen. Glasrøret indeslutter et Bomuldsfilter.

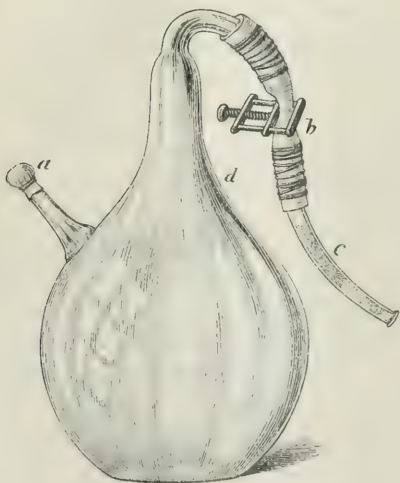


Fig. 8.

Man anbringer ikke mere Bomuld i dette, end der er nødvendig for at hindre Luftens Kim i at trænge ind i Kolben, naar

dennes Vædske gjennem det rette Rør (*a*, Fig 8) gydes ud. Ved at anvende dette Filter, undgaar man at benytte en Flamme. Kautschukdelene steriliseres ved Kogning i Vand, det Øvrige ved 2 Timers Opvarmning ved c. 150° C. i en Varmekasse. Glasrørenes Mundinger lukkes i Forvejen med Bomuldspropper. Da Kolben er af tykt Glas, maa der anvendes en vis Forsigtighed; den stilles derfor paa en Korkbrix, som atter hviler paa en Asbestplade, og der sørges for, at Temperaturen foroven og forneden i Kassen ikke viser altfor store Differenser. Efter Afkølingen tages Bomuldsproppen ved *b*, Fig. 8, bort, hvorpaa Kautschukslangen, Klemmen og Røret med Bomuldsfiltret hurtigt anbringes paa deres Plads.

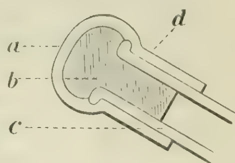


Fig. 9.

I denne Kolbe overføres den Gjærmængde, som efter den foran beskrevne Fremgangsmaade er avlet i et af Metalkarrene paa 10 Liter, p. 277, og der fyldes derpaa op med steriliseret Vand, indtil Kolben er omtrent ³/₄ fyldt. Tilsidst anbringes Proppen (*b*), Hætten (*a*) og Metaltraadsbaandene ved *d*, Fig. 9, samt lukkes med Klemmen paa Kautschukrøret (*b*, Fig. 8). Hermed er Kolben færdig til Indpakning. Denne bør være saaledes, at Kolben, naar den tages ud, har en steril Overflade, hvilket vil kunne opnaas ved f. Ex. at omgive den med Bomuld eller en anden Masse, som i Forvejen er bleven udsat et Par Timer for den netop nævnte høje Temperatur. Vedkommende Laboratorium bør ledsage Forsendelsen med en udførlig og tydelig Anvisning, hvori det Vigtigste særlig er fremhævet.

Efter min Opfordring var Jørgensens Laboratorium saa venligt at prøve denne Fremgangsmaade ved nogle Forsendelser fra Kjøbenhavn til Helsingfors og Rotterdam. Resultatet var i alle Tilfælde gunstigt.

Den i Ballonen indeholdte Gjærmasse vil være tilstrækkelig til paa sædvanlig Maade at bringe 50 Liter Urt i Gjæring. Udmaalingen heraf kan foretages ved Hjælp af Vædskestandsrøret (*f*, Fig. 4 og 6) og behøver ikke at være nøjagtig. Har det Rum, hvori Gjæringscylinderen staar, en Temperatur af c. 8° C., saa kan man efter 4—5 Døgn fylde op med ny Urt, indtil det øverste Mærke paa Glasrøret (*f*), og Apparatet er da i regelmæssig Gang; hvis Udviklingen gaar langsomt for sig, maa man vente noget længere.

Til Forsendelse af Renkulturer i absolut ren Tilstand og saaledes, at de med Lethed og Sikkerhed kunne formeres, har jeg ligeledes med et godt Udfald anvendt følgende Fremgangsmaade:

Paa de smaa cylinderformede Kolber, som almindelig kaldes Freudenreichs, lod jeg anbringe et Siderør (Fig. 10). Røret *a*, hvormed Hætten ender, fyldes som sædvanlig med Bomuld; i Kolbens opadvendte Munding (*b*) anbringes ligeledes en temmelig fast Prop deraf, og endelig et fastliggende Lag (*e*) paa Bunden. Efterat det rette Rør ligeledes er blevet forsynet med sin Bomuldsprop, steriliseres den saaledes præparerede Kolbe ved 2 Timers Opvarmning paa den foran beskrevne Maade. Efter Afkølingen sættes det rette Rør i Forbindelse med Kautschukslangen paa en tohalset Glaskolbe, i hvilken vedkommende Gjær er avlet. En Draabe heraf lader man i tykflydende Tilstand løbe ned i Bomuldslaget (*e*). Derpaa lukkes Røret med en flammerenset Asbestprop (*d*), og ovenover den anbringes atter en Hætte af Lak (*c*).

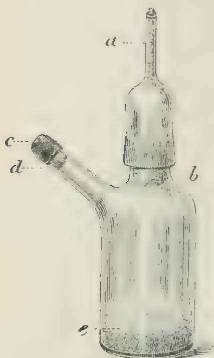


Fig. 10.

En Hovedopgave for mig ved Konstruktionen var at forhindre Gjæren i at blive inficeret, uden dog at lukke Kolben lufttæt til. Det er derfor, at Bomuldslaget (*e*) maa presses fast i Bunden, saa det ikke forlader sin Plads, og derfor bør man heller ikke med Gjærcellerne føre mere Vædske deri end højst nødvendigt. Skulde alligevel, naar Hætten bliver vendt nedad, lidt Vædske træde ud af Bomuldslaget paa Bunden, saa vil den dog ikke kunne komme udenfor; thi det rette Rør er fuldstændig lukket, og i Mundingen (*b*) vil den blive optagen af Bomuldsproppen.

Naar denne Gjær senere skal anvendes, afskrabes Lakhætten (*c*); det rette Rør ligesom den øvrige Yderflade af Kolben renses med en Flamme; ved Hjælp af en flammerenset Pincet skydes Asbestproppen ned i Kolben eller trækkes op, hvorpaa Røret hurtig føres ind i Kautschukslangen paa den tohalsede Kolbe med Næringsvædske; ogsaa kan man, hvis man ikke ønsker at arbejde med de tohalsede Kolber, let ved Hjælp af en Pipette føre steril Næringsvædske gjennem det rette Rør til Cellerne i Bomuldslaget (*e*). I Stedet for dette kan der ogsaa anvendes et Gelatinelag, men da et saadant er vanskeligt at sterilisere fuldstændigt, naar det ikke derved tillige skal miste Evnen til at stivne, saa foretrak jeg altid Bomulden.

Fortegnelse over de Bryggerier, i hvilke Rendyrkningsapparatet findes.

Det blev foran meddelt, hvorledes Apparatet, da det skulde opstilles paa Ny-Carlsberg, i visse Retninger maatte ændres efter de lokale Forhold. En anden Modifikation skyldes Dr. Elion, Laboratorieforstander i Heinekens Bryggeri i Rotterdam. Den bestaar væsentlig deri, at han har indført en Sterilisator. I den forangaaende Beskrivelse gik vi ud fra, at den koghede og altsaa sterile Urt blev tagen fra Bryggeriets Hovedledning, førend den træder ud paa Svalebakkerne. Dette er nemlig den mest praktiske Maade, paa hvilken Urtcylinderen kan forsynes med steril Urt. Man vil derfor endog i saadanne Bryggerier, hvor Ledningen hertil maa blive temmelig lang, dog vælge denne Fremgangsmaade; det er f. Ex. sket paa Tuborg ved Kjøbenhavn. Overhovedet findes der næppe ret mange Tilfælde, i hvilke man ikke kan indrette sig saaledes.

Tillade de lokale Forhold imidlertid ikke, at man slipper saa let igjennem, maa man, efterat Urten er kommen i Cylinderen, sterilisere den ved Kogning og derefter, som foran beskrevet, nedsvale og lufte den; Arbejdet bliver herved vanskeligere og tager længere Tid, men uoverkommeligt er det ikke. Det er dertil, at Dr. Elion har omgivet sin Urtcylinder med en Dampkappe. Hr. W. E. Jensen i Kjøbenhavn anvender derimod hertil et Slange-Rørsystem, som føres ind i Urtcylinderen.[1])

I temmelig høj Grad forskjellig fra de beskrevne er det af Louis Marx konstruerede Rendyrkningsapparat. Det er imidlertid kun beregnet paa at give Gjær til 1 Hektoliter Urt ad Gangen. I sit Laboratorium i Marseille har Marx tre af disse Apparater i Gang til Fremstilling af de Rendyrkninger, som han sender til forskjellige franske Bryggerier, og de have hertil gjort god Nytte.[2])

Det af Kapt. Kühle og mig konstruerede Apparat findes nu i følgende Bryggerier:

I Danmark:

Gl. Carlsberg, Ny Carlsberg og Tuborg ved Kjøbenhavn, Ceres i Aarhus og Albani i Odense.

---

1) Det erholdes hos det nævnte Firma for 50 Kroner.

2) I flere Bryggeritidsskrifter har jeg af og til set Meddelelser om andre Rendyrkningsapparater end de omtalte og Henvisning til Patenter, som ere tagne derpaa. En tydelig Beskrivelse fandt jeg dog aldrig, men derimod Misforstaaelse af det Væsentlige i Opgaven. Undertiden havde vel disse Opdagere i god Tro givet det Bedste, de formaaede, men hyppigere stak Forretnings-Reklamen frem.

I Norge:

Ringnes i Christiania.

I Finland:

Sörnäs ved Helsingfors.

I Rusland:

Trochgorny og Karneeff et Gorschanoff i Moskou, Kalinkin i St. Petersborg.

I Holland:

Baartz et Zoon i Rotterdam.

I Tydskland:

Viktoria i Berlin.

Hos Baartz et Zoon anvendes Overgjæring, alle de andre Steder Undergjæring. Dr. Elions Modifikation findes i Heinekens Bryggeri i Rotterdam og i Böhmischem Brauhause i Berlin. Paa Gl. Carlsberg anvendes 3 Gjæringscylindre, paa Ny Carlsberg 2, i Kalinkin 2 og i Viktoria-Bryggeriet 2, i hvert af de øvrige Bryggerier 1.

De nævnte Bryggerier udgjøre, som foran anført, kun en ringe Del af dem, der nu anvende mit System. Hovedsagen er og bliver den absolute Renkultur af den planmæssigt udvalgte Gjærart; kun herved faar Rendyrkningsapparatet sin Betydning. Der erholdes gode Resultater med Rendyrkningen efter min gamle Fremgangsmaade, men ikke, hvis Apparatet anvendes med en uren Gjær.

III.

Iagttagelser over Bryggeri-Gjærarter.

De foregaaende Arbejder hvile paa den Anskuelse, at Saccharomyceterne optræde som bestemte Arter, og at der er Konstans i de af mig udfundne Karakterer. Hvis disse Organismer, som nogle Forskere endnu ere tilbøjelige til at mene, med Lethed kunde flyde over i hverandre, saa Grændserne udvidskedes, vilde mine Undersøgelser i praktisk Henseende tabe den største Del af deres Betydning. Det er derfor ogsaa herimod, at mine Modstandere rettede et af de vigtigste Angreb.

At en systematisk Undersøgelse af Gjærarterne maa begynde med Endosporerne, og at den maa blive experimentel, ligger i Sagens Natur. Herfra tog jeg ogsaa Udgangspunktet for mine Studier paa dette Omraade. Af disse lærte vi ikke blot, at der gives forskjellige Saccharomyces-Arter, men vi erholdt herigjennem tillige for første Gang bestemte Karakterer for disse. Det viste sig nemlig, at Temperaturkurverne for Sporernes Udvikling vel have hovedsagelig samme Form, men at Kardinalpunkterne, navnlig de af Maximums- og Minimumstemperaturer betingede, give karakteristiske Skjelnemærker. Ogsaa i andre Retninger erfarede vi, at der er Forskjel i den Maade, hvorpaa Arterne reagere overfor Temperaturerne: I destilleret Vand naas Dødsgrændsen f. Ex. ved en forskjellig Varmegrad hos de forskjellige Arter, naar Alt forøvrigt er lige, og Differenser træde ligeledes frem med Hensyn til Knopskydning, Gjæringsvirksomhed, Hindedannelse o. s. v.

Naar de dyrkes under ensartede Forhold, kan Cellernes Form yde Karakterer for Grupper og undertiden tillige for Species; dette gjælder saavel om Bundgjær- som om Hindevegetationerne og ikke blot, naar Dyrkningen foregaar i Vædsker, men ligeledes, naar den finder Sted i et fast Næringssubstrat. Næsten alle

Saccharomyces-Arter kunne vel optræde med de samme Former, og idetmindste for de flestes, omend ikke for alles Vedkommende gjælder det, at enhver af dem i sin Udviklingskreds kan omfatte alle de af Reess opstillede Species, men de samme Former komme hos de forskjellige Arter ikke frem under de samme Betingelser. Karakteren ligger altsaa ikke i Formen for sig alene, som man tidligere antog, men tillige i de ydre Vilkaar, som fremkalde den.

Tydelige Differenser vise de i deres Forhold til Sukkerarterne, navnlig Maltosen, og overhovedet i de kemiske Omsætninger, som de fremkalde i Næringsvædsker. I Forbindelse hermed staar ogsaa, at nogle kunne anvendes i Industrien, andre derimod ikke, og at nogle endog fremkalde, hvad man kalder Sygdomme i Øllet.

Ogsaa overfor flere Farvningsmethoder viste der sig Differenser, dog kun graduelle.

Af større Betydning, idetmindste for den praktiske Analyse, synes den Differens at være, som under visse Dyrkningsforhold træder frem i Bygningen af Kultur-Undergjærarternes og de vilde Gjærarters Sporer[1]). Holde vi os kun til det mikroskopiske Billede, viser den sig deri, at Sporen hos de førstnævnte indeholder mindre tæt Plasme og af en svagere Lysbrydning; i Reglen finder man Vakuoler deri, og ofte har den Udseende af at være udtømt, i hvilket Tilfælde Væggen altsaa træder tydeligt frem; i Modsætning hertil er Sporen hos de vilde Gjærarter fuldstændig udfyldt med ensartet, temmelig stærkt lysbrydende Plasme. Kort efter at jeg i mit foran citerede Foredrag havde gjort opmærksom derpaa, indløb der fra andre Forskere Meddelelser til mig om, at

---

[1]) De ovenfor berørte Undersøgelser har jeg offentliggjort i nærværende Tidsskrift 1882, 1883, 1886 og 1888. En Oversættelse af de franske Résumés findes i de tilsvarende Aargange af Zeitschr. für das ges. Brauwesen, München. Om Gjærcellernes Forhold i fast Næringssubstrat og om den ovenfor omtalte Differens i Sporernes Bygning gav jeg en kortfattet Meddelelse i mit Foredrag i Graz 12 Juni 1887. (Se Zeitschr. für Bierbrauerei, Wien 1887, p. 518, og Centralbl. für Bacteriologie und Parasitenkunde, 1887, II B., p. 118.).

Ved Navnene »Kulturgjær«, »Kulturarter« o. s. v. betegnes ikke, at disse Arter ere opstaaede under Kulturens Indvirkning, thi derom vides endnu Intet, men kun, at de anvendes i Industriens Tjeneste. Alle andre Saccharomyceter kaldes i Modsætning hertil for »vild Gjær«, »vilde Gjærarter«. Saavidt Undersøgelserne endnu gaa, maa vi antage, at ikke blot de saakaldte vilde Gjærarter, men ogsaa Kulturarterne optræde i den frie Natur.

de havde gjort en lignende Iagttagelse, og Opfordring om snart at give en udførlig Oplysning om dette Forhold. Det viser sig imidlertid her som sædvanlig, naar man underkaster et Spørgsmaal en indgaaende experimentel Behandling, at det rummer flere Sider, end man i Begyndelsen tænkte, og at der til dets Løsning kræves en lang Række Studier. Se vi bort fra de Vanskeligheder, som den mikroskopiske Undersøgelse for sig alene frembyder, naar den skal give os bestemte Udtryk for det foreliggende Bygningsforhold, saa viser dette sig dog temmelig sammensat. Øl-Undergjærarter kunne nemlig ogsaa optræde med tæt plasmefyldte, glindsende Sporer, og omvendt kunne de vilde Gjærarter danne Sporer med den hos Øl-Undergjærarterne omtalte Bygning. Paa dette Sted, hvor Talen er om Differenser mellem Arterne, kan det endvidere have sin Interesse at fremhæve, at medens nogle, som f. Ex. min Sacch. Pastorianus I, med Lethed bringes til at udvikle Sporer med det omtalte Udseende af at være udtømte, er dette derimod meget vanskeligt med andre, f. Ex. Sacch. ellipsoideus II. At der er et ejendommeligt Bygningsforhold tilstede, som i Analysen af Øl-Undergjær kan faa Betydning, vise alle de hidtil af mig anstillede Undersøgelser; de ville derfor ogsaa i sin Tid blive offentliggjorte i Fortsættelsen af mine »Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi«.

Selvfølgelig kan man ikke i alle Tilfælde ved Hjælp af en enkelt af de foran fremhævede Karakterer skjelne imellem Arterne, men maa ofte anvende flere. Af væsentlig Betydning have de Karakterer vist sig at være, som Sporernes Udviklingsgang yde; i praktisk Henseende fordi de sætte os i Stand til uden foregaaende Rendyrkning direkte at foretage en Analyse af Bryggeri-Undergjær, naar Spørgsmaalet er, om der findes Sygdomsgjær deri eller ej.

Vi have altsaa fundet en Række Saccharomyceter, som reagere forskjellig overfor ydre Indvirkninger. At de iagttagne Karakterer ikke aldeles ere af den Natur, som de, vi kjende hos højere Organismer, kan ikke forundre os, naar vi erindre, at vore Organismer kun ere encellede. Skulle vi imidlertid opfatte dem som Arter, saa maa de fundne Skjelnemærker ogsaa være konstante. For at komme til Kundskab om, hvorvidt dette er Tilfældet eller ej, maa vi atter anstille særlige Forsøgsrækker, idet vi gjennem lange Tidsrum udsætte de antagne Arter for forskjellige Livsbetingelser, dels hver enkelt for sig i absolute Renkulturer, dels flere sammenblandede, altsaa under Konkurrencens Indflydelse. Af saadanne planmæssige Studier har jeg i Løbet af de sidste

4—5 Aar udført store Rækker, navnlig med de 6 Arter, som jeg i 1883 indførte i Literaturen, senere desuden med nogle andre, deriblandt ogsaa Bryggeri-Undergjærarter. Resultatet blev, at det var forholdsvis let at fremkalde foreløbige, ofte dybt indgribende Variationer i forskjellig Retning, men at de ved passende Dyrkning atter forsvandt, hvorefter vedkommende Art gik tilbage til sin tidligere Tilstand; at frembringe nye Arter lykkedes hidtil ikke. Praktisk Interesse for os har det, at Arterne under flere Aars uafbrudte Kultur i Ølurt kun viste smaa Svingninger. Min Erfaring gaar kort sagt ud paa, at vi med samme Ret kunne tale om Species hos disse lavtstaaende Svampe som hos de højerestaaende.

Disse Resultater maatte her omtales, fordi de, som ovenfor berørt, danne Grundlaget for mine praktiske Arbejder; en udførlig Fremstilling deraf har derimod ikke sin Plads paa dette Sted, men i Rækken af mine theoretiske Undersøgelser, og den vil ogsaa i sin Tid der blive meddelt. Vi skulle her kun lidt nærmere omtale efterfølgende to Forsøgsrækker, som have særlig Interesse for Bryggerivæsenet.

Den første behandler de individuelle Ejendommeligheder, der kunne optræde hos Bryggeri-Undergjær; ved denne Lejlighed skal jeg dog kun tale om de Udtryk, de give sig i Cellernes Form. Set fra denne Side, har Spørgsmaalet nemlig praktisk Betydning for os, naar vi skulle fremstille Renkulturer, hvad enten til Brug i Laboratoriet eller i Driften.

Det erindres, at vi efter den af mig angivne Fremgangsmaade bestandig gaa ud fra een eneste Celle. Vi tænke os nu, at vi saaledes have erholdt en absolut Renkultur, f. Ex. af Carlsberg Undergjær Nr. 1; jeg nævner netop denne Art, fordi mine fleste Forsøg bleve anstillede med den. Nogle af denne Renkulturs Celler udryste vi derpaa i Urt-Gelatinelaget paa Undersiden af det til vort fugtige Kammer befæstede Dækglas, og mærke os derpaa de Celler, hvis Stilling er en saadan, at de hver for sig kunne danne sin makroskopisk kjendelige Vegetationsplet uden at smelte sammen med andre i Nærheden. Disse Pletter, hvorom vi følgelig med Sikkerhed vide, at enhver har udviklet sig af een eneste Celle, ere dog ofte meget forskjellige, idet nogle bestaa af Celler, som paa Grund af deres pølsedannede og langstrakte Skikkelse efter Reess kunne henføres til Sacch. Pastorianus, og andre, som derimod nærmest have den Form, hvorunder vi efter det gamle System i Almindelighed tænke os Sacch. cerevisiæ. Og dog tilhøre begge een og samme Art, begge stamme fra en Udsæd af een

Celle. Ved at gjentage Forsøget kunne vi erholde yderligere Sikkerhed derfor. Fra disse Pletter inficeres derpaa nogle Kolber med Urt, saaledes at enhver i den ene Række kun modtager Celler fra en af Pletterne med den pastoriane Form, og enhver i den anden kun Celler fra en af Pletterne med Cerevisiæ-Formen. De Vegetationer, vi saaledes erholde i Urten, vise den samme Differens, men ved at fortsætte denne Dyrkning bliver Forskjellen imellem de to Rækker bestandig mindre, idet de pølsedannede Celler efterhaanden forsvinde, saa at alle Vegetationerne tilsidst komme til at bestaa af ovale. I et Tilfælde maatte der dog foretages 7 saadanne Dyrkninger, inden de ovale Celler havde faaet Overvægt i de Kolber, hvis oprindelige Udsæd bestod af pølsedannede. Dette varede omtrent 2 Maaneder. Forsøgene udførtes paa den Maade, at der fra den nærmest foregaaende Kultur overførtes en meget lille Gjennemsnitsprøve af Bundgjæren til den følgende. At der bestandig droges Omsorg for, at Renkulturerne bleve bevarede, følger af sig selv.

Medens de pølsedannede Celler endnu vare i betydelig Overvægt, indførte jeg en Portion deraf i det foran beskrevne Rendyrkningsapparat i Gjærkjælderen paa Gl. Carlsberg. Allerede efter en halv Snes Dage havde de frembragt en Vegetation, der hovedsagelig bestod af ovale Celler, og da disse gik over som Paasætningsgjær i et større Kar, udvikledes der strax en typisk Avl af ovale Celler.

Den ovale Form blev paa lignende Maade prøvet i Driften, hvor den vedblev at være oval. Begge frembragte Øl af samme Beskaffenhed, og de viste altsaa ogsaa paa denne Maade, at de tilhørte een og samme Art.

Vi lære blandt andet af disse Forsøg, at der var Forskjel paa de de enkelte Celler (Individerne) iboende Egenskaber, og som en Følge heraf gave vore mikroskopiske Undersøgelser af Gjærpletterne i Urt-Gelatinen ligesaa lidt som af de dermed anstillede første Urtkulturer os sikre Oplysninger om vedkommende Art. Dette er et nyt Bevis for, hvor ringe Værdi den mikroskopiske Undersøgelse for sig alene har, naar det gjælder om at analysere en Gjærprøve. De nye Forsøg vise os endvidere, at vi, hvis vi ønske at benytte Cellernes Reaktion overfor ydre Indvirkninger som Arts-Mærker, da aldrig udelukkende tør gaa ud fra en enkelt Celles, men maa tage Summen af talrige Cellers Reaktioner. Andre Bryggeri-Undergjærarter gave under de skildrede Forhold lignende Resultater.

Til Belysning af det berørte Problem kan endnu følgende Forsøg meddeles:

Naar vi foretage Spredekulturer i Urtgelatine, sker det hyppigt, at to eller flere Celler komme til at ligge saa tæt ved hverandre, at de i Forening danne een Plet. En saadan kan naturligvis ikke bruges, naar Opgaven er at fremstille en Renkultur, men hvis vi, som i det foreliggende Tilfælde, begynde med en saadan, ville selvfølgelig Pletter af den nævnte Beskaffenhed ligesaa godt som de, der hver kun ere dannede af een eneste Celle, indeholde Renkulturer, og alle Pletter overhovedet, forudsat at fremmede Mikroorganismer ikke snige sig ind, bestaa af een Art.

Holde vi os nu netop til de Pletter, hvoraf hver enkelt oprindelig blev dannet af flere Celler, kunne vi ofte finde et større Antal, hvis Vegetationer under Mikroskopet se nogenlunde ens ud, idet de bestaa af en Blanding af ovale og pølsedannede Celler; men inficere vi et tilsvarende Antal Urtkolber, hver fra sin Plet, kunne vi dog i disse erholde to Rækker temmelig forskjellige Vegetationer, i den ene med de Pastoriane, i den anden med Cerevisiæ-Formen i Overvægt. Idet vi vide, at hver af Pletterne fra Gelatinekulturerne oprindelig blev dannet af flere Celler, bliver den nærmeste Forklaring denne, at de to Celleformer have været tilstede i et forskjelligt Forhold i den Udsæd, som Kolberne modtoge, eller, hvis dette ikke var Tilfældet, at den ene Celle-Form har havt større Kraft end den anden i den stedfindende Konkurrence.

I dette Tilfælde var Differensen ikke saa skarp som i det først beskrevne, og ved fortsat Dyrkning i Urt forsvandt den ligeledes aldeles, idet alle de nydannede Celler ogsaa her antoge den ovale Form.

Om en endnu videregaaende Omdannelse af Ol-Undergjærens sædvanlige ovale Celler til langstrakte, pølsedannede, under Indflydelse af en bestemt Temperatur har jeg allerede i en af de citerede Afhandlinger fra 1883 givet Oplysning; men da dette Forhold ikke har direkte praktisk Betydning, forbigaas det.

Ret beset, er der intet Paafaldende i de berørte Fænomener og næppe Andet, end hvad vi ogsaa kjende fra højere stillede Svampe.

Som bekjendt, ere Meningerne endnu delte om, hvorvidt Bryggeriernes Over- og Undergjær udgjøres af een eller flere Arter. Hos Reess udtales med Bestemthed den Anskuelse, at det er to Varieteter af eet og samme Species, Sacch. cerevisiæ, og at den ene kan omdannes til den anden, navnlig fremhæver han, hvorledes

Ale-Overgjær, efter i nogle Dage at være dyrket i Urt ved 4—6⁰ C., blev omdannet til en typisk Undergjær.

Pasteur indtager, som det erindres fra en af de foregaaende Afhandlinger, p. 262, intet bestemt Standpunkt med Hensyn til Spørgsmaalene om Saccharomyceterne, men indskrænker sig til at diskutere forskjellige Muligheder; nærmest tilbøjelig er han dog til at mene, at Bryggeri-Undergjær let kan udvikle sig til Overgjær, og at dette ligeledes finder Sted i Bryggerierne selv.

Ogsaa andre Forfattere have beskjæftiget sig med dette Spørgsmaal; men overbevisende Forsøg gaves ikke, der blev ikke experimenteret med virkelige Renkulturer, og som oftest blev det ikke en Gang afgjort, om vedkommende Gjærceller tilhørte Slægten Saccharomyces eller ej. Spørgsmaalet maatte tidligere ogsaa være særlig vanskeligt at behandle, naar man erindrer, at den almindelige Øl-Undergjær hyppig indeholder Overgjær-Arter og omvendt. De Slutninger, man i denne og lignende Retninger byggede paa Iagttagelser fra Bryggeridriften selv, maatte under de forhaandenværende Omstændigheder naturligvis blive uden Værdi. Der kunde i det Højeste være Tale om at gjætte paa forskjellige Muligheder; derfor finde vi ogsaa i Literaturen, endog i den nyeste Tid, modstridende Meninger fremsatte, uden at det er muligt deraf at se, hvad der er det Rette.

Siden Begyndelsen af 1884 har jeg anstillet planmæssige Forsøg over disse Spørgsmaal. I alle Tilfælde blev der anvendt absolute Renkulturer, og Dyrkningen foretagen i de ofte beskrevne tohalsede Kolber med steril Ølurt. De Undergjærarter, hvormed jeg experimenterede, vare Sacch. Pastorianus I, Sacch. ellipsoideus I, Sacch. ellipsoideus II, Carlsberg Undergjær Nr. 1 og do. Nr. 2 samt nogle andre i Driften prøvede Øl-Undergjærarter. Forsøgene bleve anstillede ved almindelig Stuevarme, og Urten temmelig hyppig fornyet, saa at der blev avlet talløse Generationer ved en Temperatur, som ellers fremkalder Overgjæring, og med Mellemrum bleve de desuden prøvede ved en højere Varmegrad, nemlig 25—30⁰ C. Overgjæringsfænomener indtraadte imidlertid ikke, de vedbleve at være Undergjærformer; for nogle Arters Vedkommende bleve dog disse Forsøg fortsatte i over 4 Aar.

Paa lignende Maade har jeg ligeledes siden Begyndelsen af 1884 dyrket de to meget udprægede Overgjærarter Sacch. cerevisiæ I og Sacch. Pastorianus III, men ved Undergjæringstemperatur, nemlig 5—7⁰ C. I dette Tilfælde blev Næringsvædsken fornyet omtrent hver fjortende Dag. Saalænge Kolberne stode ved den angivne lave Varmegrad, var Gjæringen meget svag, navnlig for den først-

nævnte Arts Vedkommende, og altsaa uden Tegn til Overgjæringsfænomener; disse indtraadte derimod, saasnart Dyrkningen fandt Sted ved almindelig Stuevarme eller 25° C., og saaledes vare Forholdene bestandig, ogsaa da Kolberne sidste Gang bleve prøvede efter 4 Aars Dyrkning.

Naar man ønsker at bringe en svækket Overgjær tilbage til den Tilstand, i hvilken den atter viser Overgjæringsfænomener, vil man i Reglen naa hurtigere til Maalet, hvis man ikke blot foretager Dyrkningen ved en gunstig Temperatur, men tillige lufter vedkommende Vædske kraftigt.

I Følge de ovenfor fremsatte Grunde ere de saaledes beskrevne Forsøg de eneste af alle hidtil udførte, som have Beviskraft, og det Resultat, de bragte, er altsaa, at Over- og Undergjærarterne ikke, som Nogle mene, under Indvirkning af en bestemt Temperatur kunne bringes til at gaa over i hinanden. At Undergjærarterne ejheller gjennem deres Hindeformer, som Pasteur synes at antage, kunne udvikle sig til Overgjærformer, har jeg vist i min foran omtalte Afhandling om Hindedannelsen hos Slægten Saccharomyces. Sammesteds omtales ogsaa, hvorledes Undergjærarterne efter en vis Behandling kunne vise Overgjæringsfænomener gjennem nogle faa Gjæringer, hvorefter de atter vende tilbage til det Normale. Foreløbige Omdannelser kunne vi som sagt fremkalde, blivende derimod ikke. Om dette ikke ved at variere Forsøgene maaske kunde naas, er en anden Sag, her tales kun om Kjendsgjerninger, og disse vise i hvert Fald, at saadanne Omdannelser ikke foregaa under Bryggeriforholdene. Forsøgene af Reess og Pasteur kunne vi ikke forklare paa anden Maade, end at de maa have arbejdet med Blandinger af Over- og Undergjær, hvilket let kunde ske paa den Tid, disse Forsøg bleve anstillede.

Den omtalte Overgjærform, Sacch. cerevisiæ I, udgjorde i 1882 Hovedbestanddelen af en i Bryggerierne i Edinburgh og London almindelig benyttet Gjær; det er ikke usandsynligt, at den endnu der spiller en betydelig Rolle, nærmere Undersøgelser derover har jeg dog i de forløbne Aar ikke anstillet. At der foruden denne gives andre Kultur-Overgjærarter i de engelske og skotske Bryggerier, er sikkert; ogsaa i de danske anvendes forskjellige Arter.

Saaledes som min i det Foregaaende beskrevne Forskning udviklede sig, maatte de vilde Gjærarter og da navnlig de, der fremkalde Sygdomme i Øllet, først blive behandlede, og derefter Kultur-Undergjærarterne. Paa Grund af den ringe Betydning, som

Overgjæringen har, saavel herhjemme som i de fleste andre ølbryggende Lande, bleve de i denne Fabrikation anvendte Arter kun skjænkede en ringe Opmærksomhed; en gjennemført systematisk Undersøgelse blev kun givet af den ovenfor nævnte Sacch. cerevisiæ I.

Endnu i 1881 udtalte jeg i et af mine Skrifter den Opfattelse, at den i Bryggerierne anvendte Undergjær kun udgjordes af een Art, Sacch. cerevisiæ; det var da den almindelige Mening. Den forskjellige Maade, hvorpaa Gjæren vel kunde vise sig, mente man, skyldtes væsentlig de lokale Forhold, og man antog, at de iagttagne Differenser med Lethed kunde flyde over i hverandre. Man havde efterhaanden vænnet sig til at tale om Sacch. cerevisiæ som om en bestemt og godt kjendt Størrelse, og saaledes optraadte den ogsaa i Arbejderne fra Carlsberg Laboratorium indtil Slutningen af 1881. Det var først da, at det lykkedes for mig at give Spørgsmaalet sin experimentelle Behandling. Herved fik jeg da snart et helt andet Syn paa Sagen, og Hovedresultatet blev, som jeg i en af mine Afhandlinger fra 1886 fremhævede, at den Forestilling, der hidtil har været knyttet til det systematiske Navn Sacch. cerevisiæ (Undergjærform) er urigtig; thi der indbefattes derunder ikke een, men flere morfologisk og fysiologisk forskjellige Former, hvilke man med den samme Ret, som det nu er sket med talrige andre vel karakteriserede Mikroorganismer, kan betegne med særegne Artsnavne.

Jeg anstillede disse Undersøgelser efter de foran angivne Principer og med Carlsberg Undergjær Nr. 1 og Nr. 2. Ved det førstnævnte Navn betegnes, som det erindres, en bestemt Art, nemlig den første rendyrkede Gjærart, som overhovedet blev indført i Bryggeridriften. Carlsberg Undergjær Nr. 2 betyder derimod flere forskjellige Arter, der efterhaanden bleve prøvede paa Gl. Carlsberg. Resultatet er allerede angivet, Enkelthederne, som høre til den nærmere Begrundelse, ville blive meddelte i en særlig Afhandling om Saccharomyceternes Systematik. Senere have A. Jørgensen, Will, P. Lindner, Holm og Poulsen anstillet lignende Prøver med andre Bryggeri-Undergjærarter og ere komne til det samme Resultat. I Overensstemmelse hermed ere ogsaa de kemiske Undersøgelser af Borgmann og Amthor[1]).

---

[1]) Denne Literatur findes dels i Jørgensens Bog »Die Mikroorganismen der Gährungsindustrie«, Berlin 1886, i Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet 1882, 1883, 1886 og 1888, i Zeitschr. für das ges. Brauwesen, München 1887, Wochenschr. für Brauerei, Berlin 1887, Fresenius, Zeitschr. f. analyt. Chemie, XXV. Heft IV. 1886, og Zeitschr. f. physiolog. Chemie, XII. 1887.

Forinden jeg afslutter denne Sammenstilling, kan det have sin Interesse at erholde et Overblik over de Karakterer, hvormed de hidtil undersøgte rendyrkede Undergjærarter optræde i Praxis. Jeg støtter mig herved ikke blot til mine egne Erfaringer, men ligeledes til de af Aubry, A. Jørgensen og Will offentliggjorte.

Vi se da, at nogle Arter give, hvad Praktikerne kalde smukke Gjæringer med vel udviklet Skumdække, smuk Krølledannelse og god Klaring, andre derimod ikke. Ogsaa i Henseende til Attenuationen og Bundgjærens Beskaffenhed træde tydelige Differenser frem; dette gjælder ligeledes om det færdige Øls Smag, Lugt, Holdbarhed og Evne til at holde paa Skummet.

Medens nogle frembringe Øl med mild Smag og navnlig ofte med en mildere end det tilsvarende Øl, der blev fremstillet ved Hjælp af uren Gjær, findes der omvendt Arter, som give et Produkt med en stærkere Smag, undertiden frugtsyreagtig eller lidt bitter.

Som bestemte Exempler vil jeg med et Par Ord omtale Carlsberg Undergjær Nr. 1 og en af de mere udprægede Arter, vi i Bryggeriet have kaldt Nr. 2. Forsøgene ere anstillede aldeles under de samme Forhold i Gl. Carlsberg Bryggeri, saa en Sammenligning altsaa kan finde Sted, og det er netop med de af disse to Arter fremstillede Ølsorter, at Borgmann udførte sine ovenfor citerede kemiske Undersøgelser.

Nr. 1 giver et temmelig tyndt Skumdække, lave, uanselige Krøller, stærk Attenuation og langsom samt temmelig slet Klaring, et løst, lidt slimet Gjærbundfald, som for Gjærvaskere kun har temmelig ringe Værdi; ogsaa i Lagerkjælderen gaar Klaringen langsomt for sig.

Nr. 2 derimod giver et vel udviklet Skumdække, smuk Krølledannelse, svag Attenuation, hurtig og fortrinlig Klaring, en fast grødagtig Bundgjær, der er meget søgt af Gjærvaskerne, samt en hurtigere Klaring i Lagerkjælderen. Øllet af begge disse Gjærarter har fin, god Smag, men Nr. 2 Gjærens er fyldigere, dens Øl er mere kulsyrerigt og holder bedre paa Skummet; til Gjengjæld er Øllet af Nr. 1 Gjæren meget mere holdbart. Aftappet paa Flasker, som derefter bleve henstillede ved almindelig Stuevarme i et mørkt Skab, var der endnu efter 3 Ugers Forløb intet kjendeligt Gjærbundfald dannet, hvorimod Øllet af Nr. 2, behandlet paa samme Maade, allerede efter en halv Snes Dage var udrikkeligt paa Grund af den rigelige Gjærdannelse.

Gjæringerne af Carlsberg Undergjær Nr. 1 have altid opvakt Forbauselse hos de Bryggere, der besøgte vore Gjæringskjældere; det er nemlig en Gjær, som mangler alle de ydre Kjendetegn, som

Praktikeren fordrer af en god Bryggerigjær, og dog giver den et godt og navnlig et usædvanlig holdbart Produkt. Denne sidste Egenskab har især en stor Betydning, naar Øllet, som det er Tilfældet her i Landet, for største Delen sælges paa Flasker.

At Attenuationen for sig alene ikke betinger denne Forskjel i Holdbarheden mellem de to nævnte Gjærarter følger deraf, at Øl af Nr. 2 Gjæren, der ved lang Lagring var blevet ligesaa stærkt forgjæret som det tilsvarende Øl af Nr. 1 Gjæren, dog bestandig stod langt under dette i den nævnte Retning. I en anden Afhandling vil der blive givet nærmere Oplysning om disse Forhold, hvilke bero paa fysiologiske Ejendommeligheder hos de to Gjærarter.

Paa den beskrevne Maade optraadte disse bestandig i alle de Bryggerier, hvor de bleve prøvede; de fremhævede Hovedkarakterer vare i alle Tilfælde de samme.

Ved Udtrykket Holdbarhed tænkes her kun paa Gjærbundfaldets Dannelse og ikke paa Bakteriesygdomme. Betragte vi Sagen nøjere, finde vi, at Gjærbundfaldet dels kan skyldes den Kulturart, der fra Begyndelsen har været i Overtal, og som væsentlig har udført Gjæringsarbejdet, og dels vilde Gjærarter. Vi se da bort fra de Tilfælde, i hvilke flere Kulturarter have været virksomme. En Gjærart, som giver holdbart Øl, maa være en saadan, som ikke blot selv i forholdsvis ringe Grad formerer sig i det færdig lagrede Øl, men som tillige under Gjæringen formaar at holde Konkurrenterne tilbage.

Den nærmeste Aarsag til, at visse Arter udmærke sig i den sidste Retning, maa i nogle Tilfælde søges deri, at de paa en kraftigere Maade end Konkurrenterne formaa at tilegne sig Næringsbetingelserne og da navnlig Ilten, i andre derimod fornemmelig deri, at de under deres Formering udsondre Stoffer, der virke som Gifte.

Naar sammenlignende Prøver skulle anstilles over Holdbarheden i den Forstand, hvori den ovenfor er tagen, maa vedkommende Ølsorter være klare og kun indeholde en ringe Indblanding af Gjærceller; strængt taget, kræves der egentlig, at disses Antal skal være det samme i alle Prøverne. Der er, som berørt, Undergjærarter, som give et meget holdbart Øl, men med meget langsom Klaring i Lagerkjælderen, og omvendt give flere af de Arter, hvis Øl netop mangler Holdbarhed, en hurtig Klaring i Lagerkjælderen. Paa et Stadium, hvor de sidstnævnte Arters Øl er blankt, kan Øllet af de førstnævnte endnu indeholde en Uendelighed af Gjærceller og alene paa Grund deraf være mindre holdbart end det andet, skjøndt det efter fuldendt Lagring langt vil overgaa dette.

Saavel de theoretiske Undersøgelser i Laboratoriet som de rent praktiske i Driften selv have altsaa lært os, at der gives forskjellige Saccharomyces-Arter og ikke blot de saakaldte vilde Gjærarter, men tillige godt karakteriserede Over- og Undergjærarter, som anvendes i Bryggerierne. Udsatte for forskjellige ydre Paavirkninger kunne de variere i høj Grad, men naar de derpaa i længere Tid dyrkes under de oprindelige Forhold, vende de tilbage til den tidligere Tilstand. Saa længe de bleve dyrkede under Bryggeriforhold, viste de kun smaa Svingninger. Som en Følge heraf baade kunne og maa vi i Praxis regne med dem som med konstante Arter og derefter indrette vor Methode.

IV.

Om den praktiske Undersøgelse af Øllet i Lagerfadene med Hensyn til dets Holdbarhed.

Lærebøgerne over Ølfabrikationen indeholde enten slet Intet om dette Spørgsmaal eller kun nogle faa Antydninger. Det synes ogsaa ved første Øjekast at være saa simpelt, at det ikke trænger til en nærmere Behandling, men tænke vi nøjere efter, erfare vi dog snart, at det har flere Sider, og at vi i Virkeligheden bevæge os paa en usikker Bund.

De Undersøgelser, som jeg i det Følgende skal meddele, bleve udførte for omtrent fem Aar siden, altsaa paa en Tid, da mine rendyrkede Gjærarter endnu ikke vare gaaede ind i Bryggeridriften; Øllet, hvorom Talen er, blev i alle Tilfælde fremstillet ved Hjælp af uren Gjær, og det var undergjæret. En stor Del af Materialet blev mig godhedsfuldt overladt til Bearbejdelse af Hr. Bryggeridirektør, Kapt. Kühle, og i Følge min Opfordring var Hr. Laboratorieforstander Grønlund saa venlig at foretage nogle Undersøgelser paa Ny Carlsberg paa samme Maade, som de, jeg selv anstillede paa Gl. Carlsberg, over den Indflydelse, det har, om vedkommende Ølprøve luftes eller ikke, og om den udsættes for almindelig Stuevarme eller for en Temperatur at 25—27° C. Begge disse Herrer bringes herved min bedste Tak. Det var fra første Stund min Agt at meddele de erholdte Resultater i nærværende nye Række af mine Undersøgelser, hvortil de jo ogsaa i Følge deres Natur høre, men da disses Offenliggjørelse, som jeg bemærkede i Indledningen, paa Grund af andre Arbejder maatte opsættes indtil nu, blev dette ligeledes Tilfældet med nærværende Studier. Den Nytte, de maatte kunne stifte, vil forøvrigt være den samme nu som da de bleve samlede, thi Spørgsmaalet venter, som jeg foran bemærkede, endnu bestandig paa at blive behandlet.

Naar Bryggeren tager Prøver af Øllet i Lagerkjælderen, er det hans Hensigt derved ikke blot at erfare, hvorledes det er i Øjeblikket, men tillige, hvorledes det vil blive efter en vis Henstand. Han tager denne Undersøgelse rent praktisk og betjener sig derved ikke af nogetsomhelst videnskabeligt Hjælpemiddel. Det er Øllets Smag, Lugt, Farve og Klarhed, der ere Gjenstand for hans Undersøgelser. Prøverne aftappes i vel rensede og godt proppede Flasker af klart, ufarvet Glas, og for at erfare, hvor længe de kunne holde sig, stilles de ind i et mørkt Skab ved almindelig Stuevarme. Der bliver derpaa holdt Regnskab med, om Vædsken vedbliver at være klar uden Affarvning eller ej, og hvorlænge det varer, førend et kjendeligt Bundfald har dannet sig, endvidere hvorledes dette er, om det ved Rystning let fordeles i Vædsken, saa at den bliver mudret, uigjennemsigtig, eller om det kun løsner sig i Brokker, som atter temmelig hurtig synke til Bunds uden i nogen kjendelig Grad at forstyrre Klarheden. Disse Forandringer skyldes i alle Tilfælde fortrinsvis Mikroorganismers Indgriben. Bliver Vædsken uden at rystes efterhaanden uklar og affarvet, da have vi en Bakteriesygdom. En saadan hører dog til de sjeldne Tilfælde og forekommer i gode Undergjæringsbryggerier nu saa at sige aldrig. Derimod fostrer selv det bedste Øl efter en vis Tids Henstand et Gjærbundfald, dels bestaaende af Kultur-Gjær, dels af vilde Gjærarter og ofte af saadanne, der fremkalde Sygdomme, Gjærtykhed og uheldige Smagsforandringer. Det udvikles efter en forskjellig Tids Forløb, eftersom man har arbejdet med den ene eller anden Kulturart, og eftersom den er mere eller mindre uren af vild Gjær. Naar vi i det Følgende tale om Øllets Holdbarhed, tænke vi derved kun paa Gjærbundfaldet. Om Holdbarhedsspørgsmaalet se ogsaa min foregaaende Afhandling, p. 315.

Det Første, vi maa lægge Mærke til, hvis vi ville gaa sikkert frem, er, at de smaa Portioner Øl, som vi tage op fra Lagerkjælderen til Undersøgelse, ere Gjennemsnitsprøver, thi ellers kunne de naturligvis ikke give os Oplysning om Tilstanden af de store Masser, hvoraf de bleve tagne. Her møde vi imidlertid strax Vanskeligheder. Selv om en Afdeling af Lagerkjælderen er anlagt paa samme Tid og saaledes, at alle Fadene efterhaanden ere blevne fyldte med det selvsamme Øl, vil disses Indhold dog blive noget forskjelligt; det er nemlig ikke muligt hver Gang at give dem nøjagtig den samme Portion, undertiden faar et Fad en lidt for stor, undertiden en lidt for lille, men da Gjærkarrenes Indhold

i den lange Tid, der medgaar til Fyldningen af Fadene, efterhaanden kan være temmelig forskjellig, vil dette naturligvis ogsaa under de nævnte Omstændigheder kunne medføre kjendelige Differenser for Lagerfadenes Vedkommende. Følgen heraf er altsaa, at man maa tage Prøver fra ethvert Fad for sig. Spørgsmaalet bliver da, om det er muligt, saaledes som Forholdene i Driften nu en Gang ere, at erholde Gjennemsnitsprøver, og paa hvilken Maade vi bedst kunne erholde disse; at enhver lille Portion, som tages ud af det store Fad, ikke kan give en nøjagtig Oplysning om det hele Indhold, er let at forudse.

Den Fremgangsmaade, der blev anvendt, var følgende: Ved Hjælp af en Svikkelpind eller Svikkelhane blev der i Lagerkjælderen fyldt en Del af de foran beskrevne Flasker (hver rummende c. 350 Kub.-Centim.), som strax derefter bleve godt proppede. Saavel Flaskerne som Propperne vare i Forvejen steriliserede, og Prøverne toges med Forsigtighed. Saasnart de vare bragte op i Laboratoriet, bleve de stillede ind i et mørkt Skab, hvor de vare udsatte for almindelig Stuevarme, om Dagen i Reglen 16—18, om Natten ofte kun 10⁰ C.

I. Forsøg: Fra 12 Fade med 7 Maaneder lagret Exportøl toges 72 saadanne Prøver, nemlig 6 fra hvert Fad, 2 fra dets nedre, 2 fra dets mellemste og 2 fra dets øvre Lag. Efter 14 Døgns Forløb fandtes stærkt udviklet Bundfald

i 20 Flasker fra de øvre Lag;
i 7 — - - mellemste Lag,
i 3 — - - nedre Lag.

De øvrige 42 indeholdt endnu kun et ringe Bundfald.

II. Forsøg: Fra 5 Fade med 9 Maaneder lagret Exportøl toges 30 Prøver paa samme Maade som ovenfor. Resultatet blev forskjelligt fra det foregaaende; thi kun for 2 Fades Vedkommende udvikledes Gjærbundfald hurtigere i Prøverne fra de øvre end i Prøverne fra de nedre. 2 Fade viste det modsatte Forhold, og i det femte Fad forholdt de tre Lag sig ens i den nævnte Retning.

III. Forsøg: Fra 10 Fade med 4 Maaneder lagret Lagerøl toges 60 Prøver; Behandlingen var den samme som i de to foregaaende Forsøg. Efter 16 Døgn fandtes kun i 9 Flasker stærkt Gjærbundfald, og alle disse indeholdt Prøver fra Fadenes øvre Lag.

Kapt. Kühle gjorde ifølge mundtlig Meddelelse en lignende Iagttagelse med Lagerøl, der var lagret 6 Maaneder.

IV. Forsøg: Fra 5 Fade 3 Maaneder lagret Lagerøl toges 30 Prøver, som ovenfor beskrevet. Resultatet blev, at Prøverne fra de 3 Lag forholdt sig væsentlig ens; for saa vidt en Forskjel overhovedet kunde iagttages, viste den sig deri, at Gjærbundfaldet dannedes lidt tidligere i Prøverne fra de nedre end i Prøverne fra de øvre Lag.

Hovedresultatet blev altsaa, at Lagerfadenes øvre Lag i de fleste Tilfælde tidligere udviklede Gjærbundfald end de nedre, det Modsatte indtraadte sjeldnere. Prøver fra et enkelt Lag i Fadet give følgelig i Reglen ingen paalidelig Oplysning. For at undgaa de Tilfældigheder, der kunne indtræde, maa man ogsaa helst tage et større Antal.

Da Øllet, som bemærket, var færdigt lagret, Lagerøllet endog meget gammelt, kunde man vente, at de øvre Lag netop maatte være fri for Gjærceller, og at de nedre i hvert Fald indeholdt et større Antal deraf end de øvre. Det er muligt, at vi, hvis vi havde foretaget en Tælning, da ogsaa vilde have fundet dette, men vi maa her ikke glemme, at det ikke alene er Gjærcellernes Antal, men ogsaa deres Art og Tilstand, hvorpaa det kommer an. Det vilde være let at opstille Formodninger om, hvori Forklaringen kunde søges, men da jeg ikke har experimentelle Undersøgelser at støtte mig til, finder jeg det rigtigst kun at meddele Kjendsgjerningerne.

Dette var Spørgsmaalet om Gjennemsnitsprøven. Vi lære navnlig heraf, at Bryggeren i Reglen ikke vil erholde en saadan, naar han efter den sædvanlige Fremgangsmaade aftapper en eller to Halvflasker fra vedkommende Fads nedre Parti.

Vor næste Opgave er nu at betragte den Fremgangsmaade, vi skulle anvende for at komme til Kundskab om, hvilken Holdbarhed Øllet er i Besiddelse af under de Vilkaar, hvorfor det bliver udsat efter at have forladt Lagerfadene. Vi gaa herved ud fra, at det bliver godt behandlet saavel i de smaa Foustager som i Flaskerne. Naar Talen er om almindeligt Lagerøl, vil det, i det mindste som Forholdene ere her i Landet, i Reglen ikke blive udsat for en højere Temperatur end almindelig Stuevarme; noget anderledes stiller det sig derimod med Exportøllet, af hvilket det tilmed ogsaa fordres, at det skal holde sig i en meget længere Tid. Bryggeren plejer derfor ogsaa at lade Prøverne af Lagerøllet staa ved almindelig Stuevarme, medens han derimod anbringer Prøverne af Exportøllet tillige ved en højere Temperatur, f. Ex. 25° C.

Idet Øllet fra Lagerfadene aftappes paa mindre Foustager og derfra atter paa Flasker, bliver det temmelig stærkt luftet, og en

af de for Gjærcellernes Formering virksomme Faktorer træder altsaa til. Hvor man foretager Aftapningen under Kulsyretryk, vil dette naturligvis forhindres, men denne Fremgangsmaade anvendes de færreste Steder.

Prøverne i vore Flasker ere i Følge det Foregaaende mindre luftede end det Øl, der gaar ud i Handelen; at dette faar Indflydelse med Hensyn til Holdbarheden, vise følgende Forsøg:

Fra det nedre Parti i vedkommende Lagerfad bleve paa samme Maade som foran beskreven 4 af de omtalte Flasker fyldte; 2 af dem bleve derpaa strax proppede, 2 derimod først omheldte i tomme Flasker af samme Slags, alle bleve derefter stillede ind i et mørkt Skab ved almindelig Stuevarme. Det viste sig da, at det saaledes luftede Øl i de allerfleste Tilfælde tidligere udviklede Gjærbundfald end det tilsvarende ikke luftede, kun sjeldnere dannedes Bundfaldet i de to Rækker paa samme Tid, og ingensinde kom det hurtigere frem i de ikke luftede end i de luftede. Forskjellen i Tid kunde beløbe sig til flere Døgn. Disse Undersøgelser bleve anstillede med Export- og Lagerøl saavel fra Gamle som fra Ny Carlsberg, og der blev hertil taget Prøver af 89 Fade. Lagerøllet var 3 Maaneder, Exportøllet 7—12 Maaneder lagret. Heraf følger blandt Andet, at Øllet vil bevare en større Holdbarhed, naar man under Aftapningen undgaar at lufte det.

I en lignende Række Undersøgelser blev det Spørgsmaal stillet med Hensyn til de ikke luftede Prøver, om Gjærbundfaldet dannedes hurtigst ved sædvanlig Stuevarme eller ved 25—27° C. Det viste sig da, at det første var Tilfældet. Efter en Maaneds Henstand ved den sidstnævnte Temperatur vare de fleste Prøver af Lagerøllet endnu uden Spor af Gjærtykhed, hvorimod alle de tilsvarende, der stode ved almindelig Stuevarme, vare tykke efter 15—23 Døgn. I de undersøgte Tilfælde traadte den angivne Differens overhovedet stærkest frem hos denne Ølsort og svagere hos Exportøllet. Det erindres, at der her bestandig kun er Tale om Gjærbundfaldets Dannelse; Bakterier ville derimod vistnok i Almindelighed hurtigere udvikle sig ved den højere Temperatur.

Endelig blev der stillet nogle luftede og ikke luftede Prøver ind i Thermostaten ved 25—27° C.; ogsaa i dette Tilfælde bleve hine tidligere gjærtykke end disse.

Skjøndt de saaledes meddelte Resultater ere grundede paa et temmelig betydeligt Antal Analyser, tør vi dog ikke uden videre tilskrive dem almindelig Gyldighed; vi vide nemlig ikke Andet om dem, end at de svare til de beskrevne Forhold; for at kunne gaa videre, kræves der lignende Undersøgelser fra flere forskjellige

Bryggerier. Det vil glæde mig, om Andre efterhaanden vilde give Bidrag i denne Retning; jeg selv maa nøjes med at have gjort Begyndelsen.

En saadan Fortsættelse maatte da ogsaa omfatte Øl fra Fade med Spaaner og ikke blot det færdigt lagrede, men tillige Øllet paa Eftergjæringens forskjellige Stadier. I sidstnævnte Tilfælde vilde Opgaven være om muligt at udfinde, hvilke Regler der kunne opstilles med Hensyn til Øllets Bedømmelse, naar denne skal finde Sted en Tid, forinden det forlader Lagerkjælderen. Mindst komplicerede ville disse Spørgsmaal være i de Bryggerier, hvor Gjærens Rendyrkning er fuldstændig gjennemført, og navnlig, hvor man kun arbejder med een nøje kjendt Gjærart.

Nogle Bemærkninger om den jodometriske Syretitrering.

Af

J. Kjeldahl.

Den af mig til Ammoniakbestemmelse anbefalede jodometriske Syretitrering blev mange Steder optaget igjen og rosende omtalt paa Grund af Endereaktionens uovertræffelige Skarphed. Saavidt mig bekjendt, er den imidlertid de fleste Steder atter opgivet. Dette har dels været foranlediget ved Titrervædskens ringe Holdbarhed, men endnu mere ved visse Uregelmæssigheder i Resultaterne, der ere begrundede i Forhold, som ved Udgivelsen af min første Meddelelse vare mig ubekjendte. Ved passende Afstemning og Opbevaring af Hyposulfitopløsningen kan imidlertid begge Dele undgaas, og jeg skal derfor i denne lille Meddelelse kortelig omtale de Forholdsregler, som herved blive at iagttage.

Her anvendes nu altid en Hyposulfitopløsning af saadan Styrke, at 1 Kub. Centimeter svarer til 1 Milligram Kvælstof (17,7 Grm. rent Natriumhyposulfit pr. Litre).[1] Denne Opløsning holder sig uforandret i meget lang Tid, naar den fremstilles af et rent, troubleret Salt, og man drager Omsorg for at beskytte den mod Lysets og Kulsyrens Indvirkning. Den bør derfor opbevares i en lidt over Byretten anbragt sort Flaske (udvendig malet med Asfaltlak), hvori Luften trænger ind gjennem et Rør med Natronkalk i Proppen, medens Opløsningen flyder til Byretten gjennem et, i en Tubus forneden anbragt Glasrør med Hane. Man erindre blot

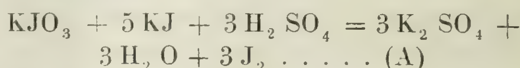
[1]) I min tidligere Meddelelse har jeg betegnet den Hyposulfitopløsning som $^1/_{20}$ normal, der stemmede med $^1/_{20}$ normal Svovlsyre. En Opløsning af ovennævnte Styrke, der altsaa skulde have været betegnet som $^1/_{14}$ normal, er pag. 21, L. 21 f. o. ved en Fejltagelse anført som $^7/_{200}$ normal.

ogsaa at anvende udkogt Vand til Fremstilling af Opløsningen; Undladelse af denne Forholdsregel har ofte fremkaldt den mest forskjellige Holdbarhed hos tilsyneladende ens behandlede Opløsninger.

Svovlsyre af tilsvarende Styrke, og end mere den stærkere fortyndede, blev her i Laboratoriet angrebet af en Mucor (vistnok en ikke hidtil beskreven Art, hvis Undersøgelse blev paabegyndt af Dr. Fr. Elfving, der da arbejdede som Gjæst i Laboratoriets fysiologiske Afdeling). Syrens Titre blev, selv ved temmelig stærk Vegetation, mærkeligt nok, næppe kjendeligt formindsket, men maa ved fortsat Udvikling formentlig dog lide en Forandring, hvorfor det er at foretrække at benytte en Syre af omtrent den dobbelte Styrke (ca. $^1/_7$ normal), der ikke angribes af nogen Organisme; der tages da 15 Kub. Centimeter heraf i Forlaget istedetfor 30.

Jeg skal nu omtale et Forhold, der ved første Betragtning skulde synes at gjøre Methoden ganske uanvendelig til nøjagtige Maalinger, men som imidlertid, naar tilbørligt Hensyn tages dertil ved Opløsningens Afstemning, er absolut uden Indflydelse paa Rigtigheden af Resultatet.

Den ved Ligningen



$$KJO_3 + 5\,KJ + 3\,H_2\,SO_4 = 3\,K_2\,SO_4 + 3\,H_2\,O + 3\,J_2 \;.\;.\;.\;.\;.\; (A)$$

udtrykte Reaktion finder i fortyndede Opløsninger ikke strax, som pag. 19 angivet, Sted i sit fulde Omfang, men forløber derimod i to Afsnit, et øjeblikkeligt, indtil de reagerende Molekyler have naat den indbyrdes Afstand, der sætter Grændse for deres gjensidige Paavirkning, og et andet, meget langsomt forløbende, i hvilket de endnu upaavirkede Molekyler under de Stedforandringer, de i Opløsningen bestandig ere underkastede, efterhaanden komme indenfor hverandres Paavirkningssfære. Dette er Hovedaarsagen til den pag. 21 omtalte »Efterblaanen«, medens Kulsyrens Indvirkning her kun spiller en lille Rolle[1]). Den anførte Opfattelse af Fænomenet bekræftes derved, at Varigheden af denne anden Fase kan afkortes

---

[1]) Den jodometriske Methode er fortrinlig skikket til Bestemmelse af den bundne Kulsyre i Vand. 30 Kub. Centimeter Syre + 100 Kub. Centimeter Vand fra Ledningen gav, direkte titreret, et Mindreforbrug af 7,9 Kub. Centimeter $^1/_{14}$ normal Hyposulfitopløsning, efter Udkogning i Platin- eller Porcellainsskaal 8,1 Kub. Centimeter, svarende til 0,289 Grm. $CaCO^3$ pr. Litre. Bortkogningen af Kulsyren har altsaa kun lidet paavirket Resultatet. Ved Udkogning i Kogeflaske faas derimod ganske falske Resultater, idet Vandet optager Alkali fra Glasset.

ved heftig Omrystning og end mere ved Opvarmning til 100° i en vel tillukket Flaske (den kraftigste »molekulare Rystning«). Ved Anvendelse af Reaktionen til Titrering vil man imidlertid blive staaende ved Afslutningen af den første Fase, der er fuldkommen skarp, og det skal da her bevises, at der ikke ved Reaktionens Ufuldstændighed indføres nogen Fejl i Resultatet.

Den Mængde Syre, som ikke strax deltager i Reaktionen, afhænger af den tilstedeværende Vandmængde og voxer med denne, derimod er den, i Overensstemmelse med ovenstaaende, theoretiske Betragtning og med det almindelige Forløb af kemiske Reaktioner, ganske uafhængig af den fra først af tilstedeværende Mængde Syre, noget der ydermere er godtgjort ved mange Forsøg. Lad os t. Ex. antage, at der ved et samlet Vædskevolumen af 100 Kub. Centimeter forbliver 2 Milligram fri Syre tilbage, saa vil der ved 200 Kub. Centimeter maaske blive 3 Milligram tilbage, men dette vil være uafhængigt af, om der oprindelig var 100 eller 5 Milligram fri Syre tilstede. Ved 100 Kub. Centimeter Vædske deltager altsaa henholdsvis 98 og 3, ved 200 Kub. Centimeter Vædske henholdsvis 97 og 2 Milligram Syre i Reaktionen.

Lad nu a betegne de anvendte Kub. Centimeter Syre, α de heri indeholdte Kub. Centimeter Normalsyre, β den ved denne Syremængde, under den anvendte Fortynding, udskilte Jodmængde, udtrykt i Kub. Centimeter Normal-Jodopløsning, samt b de til Titreringen heraf forbrugte Kub. Centimeter Hyposulfitopløsning — endvidere a' Kub. Centimeter fri Syre efter Destillationen, og α', β' og b' de hertil svarende Størrelser. Mindreforbruget af Hyposulfit skal da være lig med det Antal Kub. Centimeter Normalsyre, som er mættet med Ammoniak, altsaa

$$b - b' = \alpha - \alpha'.$$

Da Reaktionen, som sagt, ikke er ganske fuldstændig, og der altsaa ikke udskilles den fulde, med Syremængden ækvivalente Mængde Jod, vil man have

$$\alpha = \beta + k, \ldots\ldots (1)$$

hvor k er konstant ved samme Fortynding. Ved Titreringen efter Destillationen vil den samme Mængde Syre undlade at deltage i Reaktionen, saa at man har

$$\alpha' = \beta' + k \text{ (den samme Konstant)} \ldots\ldots (2).$$

Ifølge de anvendte Betegnelser har man endvidere

$$\frac{\alpha'}{\alpha} = \frac{a'}{a} \ldots (3)$$

$$\text{og } \frac{\beta'}{\beta} = \frac{b'}{b} \ldots (4),$$

det er, de i forskjellige Rumfang Syre og Hyposulfitopløsning tilstedeværende Rumfang Normalsyre og Normalhyposulfitopløsning (= Rumfang af Normaljodopløsning) ere proportionale med hine Rumfang.

Man finder altsaa

$$b - b' = \alpha - \alpha' = \beta - \beta' = \frac{\beta}{b}(b - b'),$$

hvoraf atter faas

$$b = \beta;$$

det er, Hyposulfitopløsningen skal stemme med en normal Jodopløsning. Vilde man stemme den paa en Normalsyre, hvad der ved Anvendelse til Syretitrering skulde synes det Rette, og hvad man vistnok i Almindelighed har gjort, ($b = \alpha$), vilde man have $b = \beta + k$; Ligningen $b - b' = \alpha - \alpha'$ bliver da ikke tilfredsstillet undtagen for $k = 0$ (ved stærke Normalopløsninger).

I Praxis vil man dog i Almindelighed til Afstemning af Hyposulfitopløsningen benytte en Opløsning af rent svovlsurt Ammon af bekjendt Styrke, f. Ex. en saadan, der indeholder 1 Gm. Am^2SO_4 paa 100 Kub. Centimeter. Den af 10 Kub. Centimeter heraf ved Destillation vundne Ammoniak skal da give et Mindreforbrug af Hyposulfitopløsning paa 21,21 Kub. Centimeter. Denne af Dr. Knublauch i Zeitsch. f. anal. Chemie XXI, pag. 161, til Afstemning af Normalsyre anbefalede Fremgangsmaade er unægtelig særdeles rationel til Fastsættelse af Hyposulfitopløsningens Styrke ved den Anvendelse, som den her skal finde. Det viser sig, at de ved Jod og ved svovlsurt Ammon afstemte Opløsninger ere af nøjagtig samme Styrke.

Hvis man har b = a, vil man finde

$$b' = b\frac{\beta'}{\beta} \text{ (ifølge (4))} = b\frac{\alpha' - k}{\beta} \text{ (ifølge (2))} =$$

$$b\frac{\alpha\frac{a'}{a} - k}{\beta} \text{ (ifølge (3))} = b\frac{(\beta + k)\frac{a'}{a} - k}{\beta} \text{ (ifølge (1))} =$$

$$b\frac{a'}{a} + b\frac{k}{\beta}\cdot\frac{a'}{a} - b\frac{k}{\beta},$$

som for $b = a$ bliver til $b' = a' - \frac{k}{\beta}(a - a')$,

det er, naar et vist Antal Kub. Centimeter Syre og Hyposulfitopløsning stemme med hinanden, vil dette ikke være Tilfældet med andre Rumfang heraf. Afvigelsen vil være proportional med Størrelsen af $a - a'$ og k, det vil sige, den vil være desto større, jo større Forskjellen er mellem de anvendte Rumfang, og jo tyndere

Opløsninger man arbejder med. Naar man derfor vil benytte en Syre til Afstemning af Hyposulfitopløsningen, bør dette altid ske med det samme Rumfang.[1])

Ved Tilsætningen af jodsurt Kali og Jodkalium er følgende at bemærke. Selvfølgelig maa der tilsættes mindst den efter Ligning (A) beregnede Mængde jodsurt Kali, f. Ex. til 30 Kub. Centimeter $^1/_{14}$ normal Svovlsyre 77 Milligram KJO_3, der tages 2 Kub. Centimeter 4 $^0/_0$s Opløsning = 80 Milligram. Man kunde formode, at der ligeledes maatte tilsættes den beregnede Mængde Jodkalium, nemlig 5 Molekyler, eller til 30 Kub. Centimeter $^1/_{14}$ normal Svovlsyre 296 Milligram KJ. Det viste sig imidlertid, at man kunde nøjes med langt mindre Jodkalium, ja ned til et næsten forsvindende Spor, og dog faa et Resultat, der i Hovedsagen (se nedenfor) stemmede med det Rigtige. Forklaringen hertil ligger dog ganske nær, idet der ved Reaktionen



$$2\,Na_2\,S_2\,O_3 + J_2 = Na_2\,S_4\,O_6 + 2\,NaJ$$

jo stadig dannes Jodnatrium, der med det forhaanden værende Jodat danner nyt frit Jod, der atter giver Jodnatrium, o. s. v.

Et Spor af frit Jod vil altsaa være nok til at indlede Reaktionen. Imidlertid forløber denne dog ikke i alle Henseender, heller ikke i kvantitativ, paa samme Maade som, hvor der fra Begyndelsen er tilsat tilstrækkeligt Jodkalium. Det viste sig nemlig, at man ved Anvendelse af meget lidt Jodkalium brugte en kjendelig større Mængde Hyposulfitopløsning til samme Mængde Syre; endvidere, at den vel kjendte »Efterblaanen« indtraadte overordentlig

---

[1]) Ligningen

$$\frac{\alpha}{a}(a - a') = \frac{\beta}{b}(b - b'),$$

der let udledes af det foregaaende, bliver, naar Hyposulfitopløsningen er normal, til

$$\frac{\alpha}{a}(a - a') = b - b'.$$

Er ogsaa Syren normal, faas

$$b - b' = a - a',$$

det vil sige, Forskjellen mellem Rumfang af Syre, der anvendes i to Forsøg, bliver lig Forskjellen mellem de forbrugte Rumfang Hyposulfitopløsning. Man har da $a - b = a' - b' = k$. Er Syren stærkere end normal, vil Differensen i Kub. Centimeter Hyposulfitopløsning være større end Differensen i Kub. Centimeter Syre, er den svagere end normal, vil det omvendte være Tilfældet. Dette Forhold finder ingen direkte Anvendelse her, men er forøvrigt et fint Middel til at undersøge, om en Syre er normal eller ikke.

hurtigt og stærkt, saa at det blev vanskeligt med Bestemthed at angive Titreringens Afslutning.

Man kan imidlertid ogsaa ganske udelade Jodkaliumtilsætningen, altsaa kun tilsætte jodsurt Kali i den før nævnte Mængde og Stivelsevand. Reaktionen vil da forløbe, som nys beskrevet, kun at de der nævnte Uregelmæssigheder ere end stærkere fremtrædende. At det jodsure Kali skulde indeholde et Spor af Jodid, der kunde indlede Reaktionen, kan ikke antages, da Blandingen af Svovlsyre, Jodat og Stivelsevand er og holder sig fuldkommen ufarvet. Rimeligere synes det, at Jodsyren, naar den er alene tilstede, virker iltende paa Hyposulfitet under Udskilning af Jod, som derefter ligeledes paavirker Hyposulfitet paa sædvanlig Maade, med andre Ord, at Jodsyren virker iltende paa Hyposulfitet baade med sin Ilt og med sit Jod.

Herved forklares tillige det foran omtalte Merforbrug af Hyposulfitopløsning ved Anvendelse af Jodat alene eller i forholdsvis overvejende Mængde. Jodsyren og Jodbrinten, som Svovlsyren frigjør henholdsvis af Jodatet og Jodidet, dekomponere øjeblikkelig hinanden efter Ligning (A); ere derfor Jodat og Jodid tilsatte i det efter denne Ligning beregnede Mængdeforhold, vil Jodsyren ikke kunne udøve nogen særskilt iltende Virkning paa Hyposulfitet, og Forbruget af dette vil være normalt.

Ved at tage nøjagtigt 5 Molekyler Jodkalium, kan der imidlertid endnu fremkomme smaa Svingninger i Resultatet, hvorfor et Overskud af Jodkalium maa anbefales. Ved særdeles stort Overskud heraf paavirkes Resultatet imidlertid kjendeligt i modsat Retning, idet der medgaar mindre end 30 Kub. Centimeter Hyposulfitopløsning til den tilsvarende Mængde Syre; tillige finder Overgangen til ufarvet i saa Fald Sted med en skiden rød Mellemfarve (om denne Virkning af Jodkalium og Jodbrinte jvfr. W. Nägeli, Beiträge zur näheren Kenntniss der Stärkegruppe, pag. 55). Man bør derfor ikke, som angivet pag. 20, tage Jodkalium-Krystaller paa Slump, men et bestemt Rumfang af en Jodkaliumopløsning. Fuldkommen paalidelige Resultater faas ved følgende Fremgangsmaade:

Efter endt Destillation heldes destilleret Vand efter til et paa Flasken anbragt Mærke, der angiver 100 Kub. Centimeter, i Henhold til det foran udviklede om Rumfangets Indflydelse. Derefter tilsættes 10 Kub. Centimeter af en 5 %s Jodkaliumopløsning, Stivelsevand og 2 Kub. Centimeter af en 4 %s Opløsning af jodsurt Kali. Stivelsevandet har jeg efter Bryggerikemiker

A. Petersens Raad tilberedt af opløselig Stivelse, der let fremstilles ved at digerere Kartoffelstivelse 1 Uge med fortyndet Saltsyre ved almindelig Temperatur, udvaske ved Dekantation med Vand og tørre mellem Filtrerpapir. Præparatet opløser sig ved Opvarmning med Vand, og Opløsningen holder sig, efter Mætning med Kogsalt, i god Tilstand i ubegrændset Tid.

Et Destillationsapparat til Brug ved Kvælstofbestemmelse.

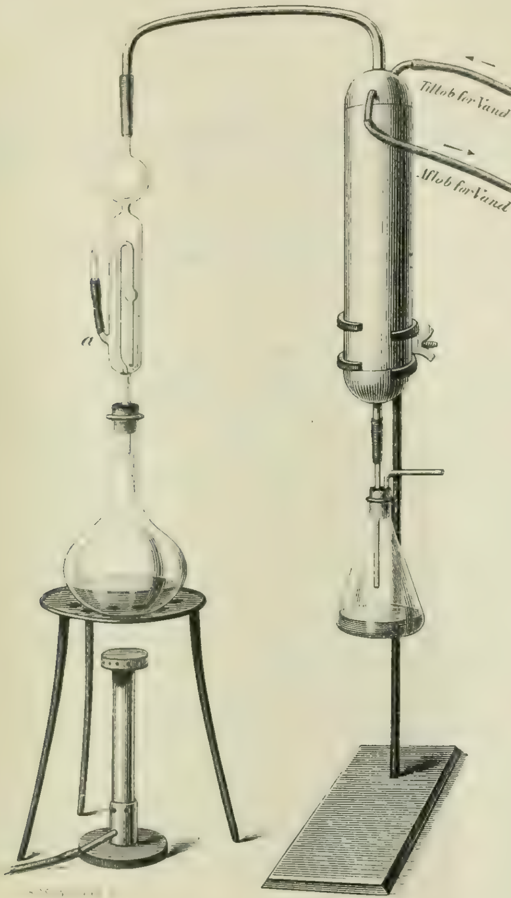
Af

J. Kjeldahl.

Kort efter min Meddelelse om Kvælstofbestemmelse blev jeg opmærksom paa tvende smaa Fejlkilder ved Ammoniak-Destillationen, nemlig Indvirkningen paa Svalerørets Glas af Vanddampene, hvorved lidt Alkali afgives til disse, og den Stænkning, som Brintudviklingen fra Zinken foraarsager, og hvorved smaa Partikler af Destillerkolbens alkaliske Indhold, trods alle mellem denne og Svalerøret indskudte Fangeapparater, kunne føres over i Forlaget. Den hele herved indførte Fejl er dog ikke stor og elimineres næsten ganske, hvor man anvender Kontrolforsøg med Svovlsyre alene (jvfr. pag. 10, L. 8 f. n.). Flere Steder, hvor Methoden indførtes, blev man opmærksom paa de samme Ulemper, og der er i den Anledning bleven beskrevet et ikke ringe Antal Destillationsapparater, hvorved sligt skulde kunne undgaas. Jeg har i længere Tid benyttet hostegnede Apparat, som formentlig byder saa stor en Sikkerhed mod de nævnte Kilder til Fejl, der i det hele kan opnaas.

Efter uden Held at have forsøgt mange forskjellige Opsatser paa Destillerkolben, kom jeg til den Overbevisning, at en Vaskning med Vand er den eneste sikre Maade til at rense Dampene for de omtalte Stænk, idet de ellers føres med af Dampstrømmen paa dens Vej, selv om man gjør denne nok saa kroget eller gjør den opadstigende paa et meget langt Stykke. Jeg anvender derfor nu det i Tegningen viste Vaskeapparat: gjennem Siderøret a, der holdes lukket med en Slange og Glasprop under Destillationen, indbringes før denne et Par Draaber Vand, som Dampene, der gjennem det ombøjede Glasrør, der ender tæt ved Vaskeflaskens Bund, træde ind i denne fra Kolben, tvinges til at passere. Det Vand, der samler sig i Vaskeflasken og holdes i Kog ved Dampene,

tilbageholder intet Ammoniak; efter endt Destillation suges det, saasnart Lampen slukkes, tilbage i Kolben. Vaskeapparatet forbindes ved en kort Gummislange med Svalerøret, der er af Tin, og hvis nedadstigende Gren gaar retliniet gjennem den af fortinnet



Kobber forfærdigede Vandbeholder, der er helt lukket og forsynet med Tilløb og Afløb for Vand efter de sædvanlige Principer. Opsamlingen af Destillatet finder Sted paa den tidligere beskrevne Maade (jvfr. pag. 17).

Om Gluten og dets Plads i Hvedekornet.

Af

W. Johannsen.

Ved »Gluten« forstaas den klæbrige, seje, gulgraa Masse, der vindes ved at ælte Hvedemel med Vand til en stiv Dej og derpaa at udvaske denne Dej under en Vandstraale, der fjerner den største Del af Melets Stivelsekorn og Skaldele foruden opløselige Stoffer. Sædvanlig lader man Dejen henligge en kort Tid efter Æltningen, og, for at undgaa store Tab ved Bortskylning, foretages Udvaskningen bedst over en Sigte. Gluten vindes alene af Hvedens Mel; af alle andre undersøgte Frøsorter faas intet tilsvarende Produkt ved den nævnte Fremgangsmaade.

Som bekjendt, bestaar Gluten — bortset fra en Del Stivelsekorn, Fedt, Brudstykker af Skallen o. s. v., der ikke lader sig fjerne ved Udvaskningen — af Æggehvidestof og Vand, hvilket sidste udgjør fra c. 60—64 % af Massen. Ritthausen[1]) angiver, at han af Gluten har fremstillet fire forskjellige Proteïnstoffer, blandt hvilke Gliadinet (»Plantelimen«) betragtes som særlig karakteristisk for Gluten; af Havre kan dog vindes en ringe Mængde af et Gliadin lignende Stof.

Det er dog fra forskjellig Side udtalt, at de af Ritthausen fundne Proteïnstoffer skulle være Produkter, dannede ved selve Analysen, Spørgsmaal, som dog her ikke kunne behandles nærmere. Men i alt Fald kan det ikke undre, at de hidtil foreliggende Forsøg paa kvantitativ Bestemmelse af »Glutenstofferne« saa godt som intet oplyse angaaende de varierende fysiske Egenskaber (større

---

[1]) »Die Eiweisskörper der Getreidearten ....«, Bonn 1872, o. fl. a. St.

eller mindre Plasticitet, Sprødhed o. a.) hos Gluten af forskjellige Melprøver, friske saa vel som lagrede[1]).

I det følgende holde vi os væsentlig til Glutenets fysiske Egenskaber og skulle her undersøge 1) hvorledes Glutenklumpen fremkommer af Hvedemelet og 2) hvilke af Hvedekornets forskjellige Væv, der her spille en Rolle.

I.

Den Mængde friskt, fugtigt Gluten, der kan udvindes af en given Prøve Mel, varierer stærkt med Fremstillingsmaaden. Men selv om man arbeider paa én og samme Maade, vise Parallelbestemmelser dog ofte betydelige Differenser. Dette kan ikke undre, da det vigtigste Apparat ved Dejens Æltning, eller i hvert Fald ved Udvaskningen, er Haanden. Balland[2]) anfører, at Afvigelserne mellem Bestemmelser, udførte samtidigt, og saa vidt mulig éns, af fire øvede Assistenter, kunde løbe op til 2 % af Melets Vægt, hvilket svarer til 5—7 % af det friske Gluten.

Slige Iagttagelser over forskjellige Personers Resultater have deres Betydning for Værdsættelsen af denne Bestemmelsesmaade som Led i Kvalitetsbedømmelsen af Mel; de vise, hvor lidet nøjagtig Glutenbestemmelsen er, absolut sét.

Naar det imidlertid, som i nærværende Afhandling, drejer sig om relative Værdier, om ydre Faktorers Indflydelse paa normale, fejlfrie Melprøver, da ere de nævnte individuelle Afvigelser uvæsentlige; her er kun Spørgsmaal om, om én og samme Arbejders Resultater stemme overens. Efter nogen Tids Øvelse bemærkede jeg snart, at mine Parallelbestemmelser ofte afvege betydelig fra hverandre, naar de bleve udførte paa forskjellige Dage; paa én og samme Dag fik jeg derimod sædvanligvis god Overensstemmelse, især naar Udvaskningerne foretoges i hurtig Rækkefølge. Af 40 Gram Mel vandtes saaledes én Dag 10,2 Gram friskt Gluten, den følgende Dag 10,75 Gram. Paa én og samme Dag vandtes derimod 10,1—10,3 Gram; af 25 Gram (andet) Mel 7,9—8,0 Gram, 7,6—7,8 og saa fremdeles. Forsøgsrækkerne udførtes derfor altid paa samme Dag, naar da ikke netop Dejens Henstand var nødvendig. Da Gluten-

---

[1]) Sml. Gottlieb, Hvedeundersøgelser; Tidsskrift f. Landøkonomi. 1885, S. 364. De i Tab. VII., S. 391, sammenstillede Resultater vise tilstrækkelig Methodernes ringe Værdi i saa Henseende. Nærmere om denne Tabels Indhold, sml. denne Afhdl. S. 335.

[2]) Journal de pharm. et de chimie, 5 série, T. 8. 1883, p. 358.

klumpen under fortsat Vaskning stadig aftager i Vægt, kan denne naturligvis ikke blive konstant, men man maa nøjes med at iagttage det afløbende Vaskevand. Naar dette næsten synes klart, kan Operationen ophøre — Udvaskning i en bestemt Tid, f. Ex. 5—15 Minuter, alt efter Dejmængden, synes ikke at forøge Nøjagtigheden —, og det gjælder da om at faa den vundne Klump »haandtør«. Man ælter i den Hensigt Klumpen afvexlende i venstre og højre Haand, idet man samtidigt aftørrer den frie Haand i et Klæde. Efter faa Minutters Forløb afgiver Glutenet ikke mere Vand og kan da vejes.

At de Afvigelser, som skyldes forskjellig Fremgangsmaade ved Glutentilberedningen, ikke — i alt Fald langtfra alene — ere begrundede i forskjellig Vandholdighed eller forskjelligt Indhold af fremmede Stoffer (Stivelse, Skaldele o. s. v.), fremgaar af Tørstof- og Kvælstofbestemmelserne, af hvilke jeg skal anføre nogle som Exempler. Tørstofmængden bestemtes ved Tørring til konstant Vægt, ved c. 110°, Kvælstofmængden efter Kjeldahl.

Af en Melprøve fra »de forenede Dampmøller«[1]) gave Portioner à 40 Gram, æltede med 20 Gram Vand og udvaskede over Florsigte:

	friskt Gluten; i Gram.	% Vand i Glutenet.	Tørstof; i Gram.
umiddelbart efter Æltning	9,8	60,7	3,71
efter 10 Minuters Henstand	10,1	61,4	3,91
efter 60 — —	10,75	62,6	4,02

Det friske Gluten er herefter vandrigere, naar Dejen har henligget nogen Tid, end naar den strax udvaskes, men dette betinger ikke alene det efter Henstand vundne større Udbytte af Gluten, hvad der ses af den sidste Kolumne. Dette Forhold, som iøvrigt Benard og Girardin have paavist[2]), illustreres ogsaa af de nu følgende Tal, af hvilke det tillige sés, at Tilvæxten virkelig skyldes en Forøgelse af den »kvælstofholdige Substans«' Mængde.

Samme Melprøve, à 40 Gram med 30 Gram Vand til Æltning, gav:

	friskt Gluten; i Gram.	% Vand i Glutenet.	Tørstof; i Gram.	% Kvælstof i Tørsubst.	Kvælstofmængde; i Milligr.
udvasket strax	8	61,6	3,07	13,13	403
— efter 60 Minuter	10,6	62,7	3,95	13,39	530

[1]) Hr. Direktør, cand. polyt. Bang, der med stor Liberalitet har overladt mig Forsøgsmateriale og meddelt mig alle ønskede Oplysninger, Melfabrikationen vedrørende, maa jeg her bringe min varmeste Tak.

[2]) Journal de pharm. et de chimie, 5 série, T. 4, 1881. p. 127.

Samme Mel, à 40 Gram med 40 Gram Vand til Æltning, gav:

	friskt Gluten; i Gram.	% Vand i Glutenet.	Tørstof; i Gram.	% Kvælstof i Tørsubst.	Kvælstofmængde; i Milligr.
udvasket strax	3	61,3	1,16	13,34	155
— efter 60 Min.	4,9	63,3	1,80	13,26	239.

Af samme Mel tilberedtes af 40 Gram en Dej ved 40° C. Efter 1/2 Times Henstand udvaskedes Halvdelen med Vand af c. 20°, den anden Halvdel med Vand af 40°. Der vandtes:

	friskt Gluten; i Gram.	% Vand i Glutenet.	Tørstof; i Gram.	% Kvælstof i Tørsubst.	Kvælstofmængde; i Milligr.
udvasket ved 20°	5,7	63,4	2,09	13,36	279
— ved 40°	5,5	63,5	2,01	13,27	267.

Dette sidste Forsøgs Betydning vil senere blive omtalt nærmere; paa dette Sted skal det, sammenholdt med det andet meddelte, illustrere, at Tørstoffet i Gluten af en given Melprøve og fremstillet ved saadan Variering af Methoden som den, hvorved dette Afsnits Resultater ere vundne, kan antages at have saa nogenlunde konstant Sammensætning. Helt bortset fra de vundne Glutenklumpers fuldkomne Overensstemmelse i Plasticitet, fremgaar dette af de kun smaa og ganske uregelmæssige Svingninger i det procentiske Indhold af Kvælstof, som er anført i de ovenstaaende Exempler, hvor Middeltallet af alle Bestemmelserne er 13,29 %.[1]) Vandholdigheden svinger derimod tydeligt paa en lovmæssig Maade. Jo mere Vand der anvendes til Dejen, og navnlig jo længere denne henligger før Udvaskningen, desto vandrigere bliver Glutenet; Tilberedning ved en højere Temperatur har samme Virkning. Dette fremgaar, i alt Fald tildels, allerede af Benard & Girardin's ovennævnte Undersøgelser[2]) og stemmer ganske med Forholdene ved organiserede Legemer, f. Ex. Frøs, Udbulning i Almindelighed.

---

[1]) Gluten af forskjellige Melprøver varierer ofte betydeligt m. H. til Kvælstofindholdet. Gottlieb har (p. d. anf. Sted. Tab. VII) af 8 Prøver, som henholdsvis højeste og laveste Værdi 14,27 % og 13,47 %. Gluten af samme Mel, før og efter Lagring, opviser i to Tilfælde store Svingninger, saaledes f. Ex. Lykkesgaard Hvede endog fra 13,47 – 13,96. Idet disse Svingninger i det hele ikke vise nogen Lovmæssighed, tjene de som yderligere Illustration paa de »absolute« Glutenbestemmelsers ringe Værd som Bevismateriale.

[2]) Om forskjellige Stoffers Indflydelse paa Vandholdigheden sml. Ballands Angivelser. Journ. de pharm et chim. 5 série, T. 8. 1883, p. 438.

Disse Spørgsmaal skulle dog ikke her afhandles; Hensigten med det anførte er kun at vise, at de i det følgende anførte Glutenbestemmelser, der næsten altid ere Gjennemsnit af to parallele Forsøg, virkelig kunne bevise det, de skulle. Den Omstændighed, at Resultaterne stadig gaa i samme Retning, turde maaske være en lige saa god Dokumentation.

Hvorledes Bestemmelserne af det friske Gluten ere udførte i de enkelte Forsøgsrækker, vil fremgaa af det følgende; naar intet er sagt, er der anvendt 25 Gram Mel til hver Analyse. Med denne Melmængde har jeg faaet de bedste Overensstemmelser; ved større Mængder, navnlig udover 40—50 Gram, kan Haanden ikke magte Dejklumpen, der da bliver uensartet behandlet og ikke saa godt udvasket.

Æltningen er stedse foretagen i en Porcelænmorter, 2—5 Minuter, alt efter Vandmængden, hvorpaa Dejen, naar den skulde hvile, er bleven anbragt i en lille Porcelænskaal, dækket med en Glasplade. Udvaskningen foretoges ved Hjælp af en fin Straale Ledningsvand, der mod Slutningen af Operationen forstærkedes, over en Sigte, dels en almindelig Haarsigte, dels en Sigte af fineste Flor. Udvaskningen omtaltes nærmere i Begyndelsen af dette Afsnit; her skal kun tilføjes, at Vejningerne ere foretagne paa en almindelig, god Standvægt, da Præcisionsvejning hurtig viste sig uden Nytte.

Glutenet er kjendt siden Midten af forrige Aarhundrede, Italieneren Beccari angives af Ritthausen som dets første Fremstiller. At Gluten findes færdigt dannet i Hveden, er den ældste og almindeligste Opfattelse. Raspail's Anskuelser[1]), at Glutenklumpen opstaar af sammenfiltrede Cellehinder, samt at Kvælstofindholdet skyldes en Absorption af Atmosfærens Kvælstof, synes ikke at have været almindeligt antagne. De bleve fjernede af Payen[2]) ved hans Undersøgelser over Planternes Cellevægge. Disse meget omfattende, grundlæggende Arbejder, hvis Resultater bl. a. førte til den først i nyeste Tid atter omtvistede Lære, at Cellevæggenes »væsentlige« Bestanddel er rent Cellulose, viste, at Glutenet ikke dannes af Cellehinderne, men især bestaar af

---

[1]) Sml. De Candolle: Physiol. végétale. T. I., 1832, p. 327. Originalen i Raspails Annales des sciences d'observation, 3die Bd. (?), har ikke været mig tilgjængelig.

[2]) Mémoires présentées par divers savants à l'académie des sciences, T. 9. 1846. (»Mémoires sur les développements des végétaux . .«, 3me mémoire) p. 11.

Æggehvidestof. Payen nævner endog fire Proteïnstoffer, hvis Identitet med Ritthausens ikke her skal diskuteres. Payen angiver, at Glutenet findes aflejret mellem Stivelsekornene i Hveden; han betragter Celleslimen i de Stivelse førende Frøhvideceller ligefrem som Gluten.

Senere har Peligot[1]) antaget, at Fedtstof var nødvendigt for at Gluten kunde fremkomme ved Melets Behandling med Vand o. s. v. Peligot bestrider ingenlunde Glutenets Proteïn-Natur; han mener kun, at det er Hvedemelets Fedt, som muliggjør Glutendannelsen, d. e. Proteïnstofpartiklernes Sammenklæbning til én Masse, og fremdeles, at Melets Fedtmængde (c. 1⁰/₀) just er afpasset i det gunstigste Forhold. Til Støtte for disse Antagelser anføres kun ét Forsøg, i hvilket Mel, udtrukket med Æther, ikke gav Gluten, og endvidere, at Mel, tilsat c. 4⁰/₀ Hvedefedt (Ætherudtræk af samme Melsort), kun ved meget forsigtig Udvaskning gav næsten samme Glutenmængde som normalt Mel. Fedtstofferne tilskrives en stor Betydning ogsaa under Brødtilberedningen; den Brunfarvning og større eller mindre Klæghed, som karakterisere Brød af klidholdigt Mel, tilskriver saaledes Peligot Klidens betydelige Fedtrigdom (3—5⁰/₀), medens vi nu vide, at kemiske Fermenter og Organismer her spille en Rolle.

Peligots Angivelser om Fedtets Betydning synes dog ikke at have været almindeligt accepterede. Det maa vel ogsaa bero paa en eller anden Biomstændighed ved Forsøget, at hans fedtfrie Mel ikke gav Gluten. Jeg har gjentagne Gange udtrukket Hvedemel med ren Æther ved almindelig Temperatur; efter fuldstændig Fordampning af den i Melet tilbageholdte Æther — Melet laa flere Timer, ofte omrørt, i flade Papirkapsler — gav Melet lige saa meget Gluten som den oprindelige Prøve. Glutenet var kun ikke gulgraat, men hvidgraat, da Ætheren foruden Fedt o. l. fjerner det i Vand uopløselige Farvestof, som giver Melet sit smukke Skjær, og som gjenfindes i normalt Gluten. Peligot hævder i sin Lærebog i agrikulturkemisk Analyse[2]) endnu Rigtigheden af sit Forsøg; men bemærker dog, at med Antagelsen af et »Glutenferment« kan det Fedt opløsende Middels uheldige Indflydelse ogsaa bero paa Evne til at koagulere Fermentet.

---

[1]) Peligot. Sur la composition du blé. Annales de chim. et de phys. 3. série. T. 29. 1850. p. 5—34.

[2]) Peligot. Traité de chimie analytique appliquée à l'agriculture. Paris 1883. p. 367.

Antagelsen af, at et sligt Ferment skal spille en Rolle ved Glutenets Fremstilling, har i de senere Aar vundet Indgang flere Steder. Glutenet skal herefter ikke være tilstede som saadant i Kornet eller i det tørre Mel, men først opstaa, naar Melet befugtes, ved Hjælp af et Ferment, der alene skal findes i Hveden, og som nærmest skal ligne Fibrinfermentet, der omdanner Blodets og Lymfens Fibrinogen til Fibrin. Efter Weyl[1]) skal saaledes Kornsorternes Proteïnstoffer hovedsagelig eller udelukkende være tilstede som Globuliner (»Plantemyosin«), en Antagelse, som dog er mere theoretisk-opstillet end bevist ved Forfatterens Forsøg, af hvilke man vel i det højeste kan slutte, at noget Globulin findes. Disse Globuliner skulle nu efter Bischoff & Weyl[2]) være Modersubstans for Glutenet. De nævnte Forfattere finde nemlig Glutenfremstilling umuliggjort, naar de i Stedet for Vand anvende en 20 %os Kogsaltopløsning, eller naar Melet først udvaskes med en 15 %os Opløsning, med fortyndet Saltsyre (1 pro mille) eller med fortyndet Sodaopløsning, og de angive, at Grunden hertil dels er Globulinernes Fjernelse ved Udludning, dels Saltets Virkning paa Fermentet. Opvarmning i 2—4 Døgn til 60° skal ligeledes have gjort Glutenfremstilling umulig. Forsøg paa at udvinde det formodede Ferment gave intet Resultat. Iøvrigt meddeles i Afhandlingen ingen Detailler, saa at Angivelserne ofte blive meget vage. Peligot, der i sin nævnte Lærebog synes at sympathisere med Fermenthypothesen, i hvilken han ikke ser Modsigelser mod egne Forsøg, bemærker ogsaa, at nye Forsøg dog ere nødvendige, førend Hypothesen kan accepteres.

Imidlertid havde Hr. Laboratorieforstander Kjeldahl lejlighedsvis anstillet en Del Forsøg over Spørgsmaalet, hvilke dog ikke bleve offentliggjorte[3]), da Fremstillingen af det hypothetiske Ferment ikke lykkedes. Hvad der ikke desto mindre gjorde Fermenthypothesen meget sandsynlig, var en særdeles i Øjne faldende Overensstemmelse mellem Temperaturens Indflydelse paa tidligere undersøgte Fermenters Virkning[4]) og paa Glutenfremstillingen. Behandledes Melet ved 0° fik man saaledes intet eller næsten

---

[1]) Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. 1, p. 96.

[2]) Berichte d. deutschen chem. Gesellschaft, Bd. 13, 1880. p. 367.

[3]) Gottlieb, p. d. anf. Sted, p. 385 o. fr. meddeler nogle af Kjeldahls Iagttagelser, som han tildels bekræfter. — Hr. cand. polyt. Ph. Gram, som assisterede ved Forsøgene, har velvilligt meddelt mig alle sine Optegnelser. der her ere benyttede med Hr. Kjeldahls Samtykke.

[4]) Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, Bd. 1, S. 136, 180 og 331.

intet Gluten, men derimod ved stigende Temperatur mere og mere indtil c. 40°; herudover aftog atter Glutenmængden. Som Exempel kan følgende Forsøg anføres.

Portioner à 40 Gram Mel hensattes, jævnlig omrørte, i Vandbad ved de paagjældende Temperaturer, indtil Melet omtrent havde antaget disse; derpaa tilsattes 30 Gram (75 %) af det ligeledes rigtigt tempererede Vand. Efter udført Æltning atter Henstand i Vandbad 1/2 Time. (Ved 0° henstod Prøven dog i Isvand 2 1/2 Time). Derpaa udvaskedes Dejen over en Haarsigte med Ledningsvand, hvis Temperatur var c. 15°. Glutenet vejedes i fugtig Tilstand. Resultatet ses af følgende Tabel.

Temperatur........	0°	5°	10°	15°	25°	40°	50°	60°	70°
Glutenmængde; i Gram:	0	6	10	11,5	13	15,5	11,5	7	4
— ; i % af Melet:	0	15	25	28,8	32,5	38,8	28,8	17,5	10.

Dette Forhold peger unægtelig stærkt hen paa et Ferments Nærværelse, med hvilken Antagelse ogsaa de andre af Hr. Kjeldahl foretagne Forsøg harmonerede. Saaledes spiller — som det allerede ovenfor blev omtalt — den Tid, i hvilken man lader Dejen henligge før Udvaskningen, en betydelig Rolle. Exempelvis anføres følgende to Forsøgsrækker. Til de enkelte Bestemmelser anvendtes 40 Gram Mel + 30 Gram Vand (75 %).

I. Ved Stuetemperatur, c. 19°.

Udvasket strax efter Æltning:	1 Gram	friskt Gluten	(2,5 % af Melet)
— 5 Min. -	—	4 -	—	(10 %)
— 10 — -	—	8,5 -	—	(21,3 %)
— 20 — -	—	10 -	—	(25 %.)

II. Ved 40°. (Optimumstemperaturen, saml. ovenfor.)

Udvasket strax efter Æltning:	0,5 Gram	friskt Gluten	(1,3 %)
— 15 Min. -	—	9,5 -	—	(23,8 %)
— 60 — -	—	11,2 -	—	(28 %.)

Ved de S. 334—35 anførte egne saa vel som ved de franske Forsøg fandtes dog langt ringere Differenser, hvilket især skyldes Forskjel i de anvendte Sigters Finhed. Her anvendtes saaledes Haarsigte, i de tidligere anførte Forsøg derimod Flor. Nærmere herom S. 343.

Kjeldahl har end videre vist, at den til Dejen anvendte Vandmængde har stor Indflydelse; over 60 % Vand til Dejen giver kjendeligt mindre Gluten, og med meget større Vandmængder faaes intet eller kun lidet Gluten. Fremdeles formindskede fortyndet

Syre, anvendt i Stedet for Vand til Dejens Tilberedning, ikke Glutenmængden før end ved en vis Concentration, Svovlsyre f. Ex. 1/40 normal. Den ringe Nøjagtighed, hvormed der arbeides, tillader ikke at afgjøre, om ganske ringe Syremængder gave et Plus af Gluten, i Lighed med Diastasens Forhold; de foreliggende Tal tyde derpaa og staa i alt Fald ingenlunde imod Fermenthypothesen. Ligeledes hindrede Kvægsølvtveklor, selv i meget svag Opløsning (0,1 %), og andre Metalsalte Glutendannelsen.

Endelig var der ét Forhold, som meget bestyrkede Formodningen om Fermentet, nemlig det, at, naar man blandede friskt Hvedemel med gammelt, ikke Gluten givende, eller med Bygmel, saa fik man — ved passende Blandingsforhold — meget større Mængder Gluten, end der kunde ventes af det friske Hvedemel alene. Saaledes gav f. Ex., efter 3/4 Times Henstand

20 Gram Bygmel + 15 Gram Vand: 0 Gram Gluten,
20 Gram Hvedemel + 15 Gram Vand: 6,5 Gram Gluten,
men 20 Gram Hvedemel + 20 Gram Bygmel
+ 30 Gram Vand: 9,5 Gram Gluten.

Dette sidstnævnte Gluten var af en musgraa Farve.

En Prøve gammelt Hvedemel gav næsten intet Gluten,
20 Gram + 15 Gram Vand: 1,7 Gram Gluten,
20 Gram nyt Mel + 15 Gram Vand: 6,5 Gram Gluten,
20 Gram gammelt + 20 Gram nyt Mel
+ 30 Gram Vand: 12 Gram Gluten.

Andre Forsøg have ikke altid givet saa gunstige Resultater som de her fremdragne; oftest maa der tilsættes en forholdsvis større Mængde godt Hvedemel for at faa Virkningen frem.

I alle de meddelte Forsøg laa det nær at anvende Fermenthypothesen til Forklaring af Resultaterne; det eneste, der manglede, var Isoleringen af selve Fermentet. Forskjellige Fremgangsmaader prøvedes, alle med negativt Resultat, hvorfor Hr. Kjeldahl foreløbigt stillede Sagen i Bero.[1])

Ved at sysle med udbulnede Hvedekorn, bemærkede jeg, at, naar man gjør et Indsnit tværs over Kornet og derpaa hurtigt bryder det over, saa dannes der fra Kjærnen øjeblikkelig kortere

---

[1]) Antydninger, der lode haabe et gunstigt Resultat, manglede ganske vist ikke; saaledes fik Assistent Gram én Gang et ringe Glutenudbytte af ophedet og atter afkølet Mel, naar Dejen tilberedtes med et Udtræk af Hvedemel, medens han, ved Anvendelse af Vand ikke fik Gluten. Senere lykkedes sligt dog ikke. (Sml. Klidudtræks Virkning, S. 353 Anm. 2.)

eller længere, seje Traade, der ganske synes at have Glutens Karakter, hvilket ogsaa bekræftedes ved mikroskopisk Iagttagelse. Min Tro paa Glutenfermentet rokkedes noget derved, og end mere, da det viste sig, at gulmodne, endnu friske Hvedekorn frembøde det samme Forhold, sædvanligt endog tydeligere. Jeg søgte derfor Spørgsmaalet belyst ved nogle Kontrolprøver med et »kunstigt« Mel, som fremstilledes af Hvedestivelse og tørt, pulveriseret og gjennem fineste Flor sigtet Gluten.

Gluten af friskt Hvedemel blev efter Ritthausens Forskrift[1]) tørret ved Æltning i absolut Alkohol, og derpaa i Exsiccator i Vacuum befriet fra Resten af Alkohol og Vand. Det færdige »kunstige Mel« indeholdt saa meget tørt Gluten, som svarede til 28—30 % friskt. Dette Mel lod sig godt anvende til Glutenfremstilling paa almindelig Maade; det fordrede noget mere Vand for at give en tjenlig Dej. Overfor Varme, Syrer, Sublimat o. s. v. forholdt det sig ganske som almindeligt Mel.

Temperaturens Indflydelse ses af følgende Forsøgsrækker, udførte paa lignende Maade som de S. 339 nævnte Forsøg. Kun foretoges Udvaskningen med Vand af den paagjældende Temperatur[2]).

I. Anvendt Portioner à 50 Gram Mel + 30 Gram Vand (60 %). Udvaskning efter 1/2 Times Henstand gav:

ved c. 9°[3]):	6,2 Gram	friskt Gluten	(12,4 %)
- c. 19°:	8,2 —	- —	(16,4 %)

---

[1]) »Die Eiweisskörper etc.« p. 30.

[2]) Denne Afvigelse har dog ikke synderlig Betydning, som det bl. a. fremgaar af følgende, exempelvis anførte Forsøg: Hvedemel gav med 60 % Vand ved 20°: 27 % Gluten. Ved 40° erholdtes, naar Udvaskningen skete ved 15°: 32 %; ved 40°: 30 %. Ved 50° fik man, ved Udvaskning ved 15°: 27,3 %; ved 50°: 26 % — Afvigelserne vare endnu mindre ved det Side 335 omtalte Parallelforsøg.

[3]) Melet til denne Bestemmelse, der skulde foretages ved 0°, stod 24 Timer i Isvand i et koldt Rum (c. 3°) og havde ved Forsøgets Begyndelse c. 2°; Æltningsvandet og Morteren 1,5°. Ved Æltningen steg, paa Grund af Arbejdet, Dejens Temperatur til 9° og forblev uforandret under Hvilen. Ved Anvendelse af mere Vand (II.) var Arbejdet ved Æltningen, og dermed Temperaturforhøjelsen, forsvindende.

Tilsvarende Forhold forklare Afvigelsen mellem Kjeldahls og Gottliebs Angivelser. Naar den sidstnævnte altid ved 0° fik Gluten dannet (sml. det anførte Sted, S. 387), saa ligger det utvivlsomt deri, at han til Dejen anvender 50 % Vand, Kjeldahl derimod 75 %, ved hvilken sidste Vandmængde Arbejdet ved Æltningen er forsvindende. Fremstillet paa den af Gottlieb angivne Maade, vil Dejen ikke kunne faas under 6—8°.

ved	30°:	9,0	Gram	friskt	Gluten	(18,0 %)
-	40°:	5,0	—	-	—	(10,0 %)
-	50°:	0,5	—	-	—	(1,0 %)
-	60°:	0	—	-	—	(0 %).

II. Anvendt Portioner à 50 Gram Mel + 35 Gram Vand (70 %); ellers som I. Resultatet var:

ved c.	2°:	0	Gram	friskt	Gluten	(0 %)
-	22°:	8,5	—	-	—	(17 %).

Efter 3 Timers Henstand vandtes ved c. 2°: 0,3 Gram = 0,6 % Gluten.

III. Med et andet »kunstigt« Mel, fremstillet ved Blanding af 200 Gram friskt Gluten med 500 Gram Kartoffelstivelse, Tørring ved c. 30—40° og derpaa følgende Pulverisering og Sigtning, foretoges følgende Forsøg, som slutter sig til de forrige. Det udførtes med Portioner à 40 Gram + 25 Gram Vand (62,5 %), ellers som I. Der vandtes:

ved c.	8°:	5,4	Gram	friskt	Gluten	(13,5 %)
-	15°:	7,0	—	-	—	(17,5 %)
-	22°:	7,9	—	-	—	(19,8 %)
-	26°:	8,2	—	-	—	(20,5 %)
-	37°:	6,4	—	-	—	(16,0 %)
-	43°:	4,2	—	-	—	(10,5 %)
-	48°:	2,4	—	-	—	(6,0 %).

Kvægsølvtveklor (Sublimat) virkede paa kunstigt Mel som paa almindeligt Hvedemel. Exempelvis følgende:

40 Gram Hvedemel, æltet med 20 Gram Vædske (50 %), gav:

med Vand		:	9,5 Gram	friskt	Gluten	(23,8 %)
- Sublimatopl.	0,1 %	:	6,5 —	-	—	(16,3 %)
- —	1 %	:	0 —	-	—	(0 %).

Samme Mængde kunstigt Mel gav, æltet med 25 Gram Vædske (62,5 %):

med Vand		:	6,4 Gram	friskt	Gluten	(16 %)
- Sublimatopl.	0,1 %	:	2,4 —	-	—	(6 %)
- —	1 %	:	0 —	-	—	(0 %),

altsaa ogsaa her en paafaldende Analogi. At der i de Kjeldahl'ske Forsøg (S. 340) slet intet Gluten vandtes, selv ved en kun 0,1 % holdig Sublimatopløsning, er vel begrundet i den ved disse Forsøg anvendte større Vandmængde, et Forhold, som vi nedenfor komme tilbage til.

Ogsaa fortyndede Syrer, saa vel som Saltopløsninger, virkede paa ganske lignende Maade paa kunstigt som paa naturligt Mel. — Ved alle disse Overensstemmelser, særlig med Hensyn til Temperaturens Indflydelse, taber Glutenferment sine bedste Støtter, om den end endnu ej direkte er modbevist. Melets Forhold til Sublimat og Syre blev derfor underkastet en nøjere Prøvelse, der gav Resultater, som vel neppe kunne forenes med Fermenthypothesen; i alt Fald maatte Glutenfermentet indtage en Særstilling udenfor de andre Fermenter.

I alle ovenfor (undtagen i Indledningen) meddelte Forsøg har man ladet Udvaskningen foregaa over en middelfin Haarsigte. Medens man, ved at tilsætte 50—60 % Vand til Melet, ikke faar mere Gluten ved at ombytte Haarsigten med en Sigte af fineste Flor, saa spiller dog Sigtens Finhed en betydelig Rolle ved vandrigere Dej, ligesom ogsaa, naar Glutenudbyttet nedsættes ved andre skadelige Indvirkninger. Saaledes vandtes efter 1/2 Times Henstand af Dej, tilberedt med

	Udvasket over Florsigte.	Udvasket over Haarsigte.
50 % Vand	25 % Gluten	25,5 % Gluten
80 % —	25 % —	20 % —
100 % —	11 % —	0 % —

Endnu tydeligere træder Forholdet frem ved Forsøg over Tidens Indflydelse, som det vil ses af nedenstaaende Tabel. For lettere Oversigts Skyld angives Udbyttet af friskt Gluten kun i Procent af Melets Vægt.

Udvasket	50 % Vand til Dejen.		75 % Vand til Dejen.		100 % Vand til Dejen.	
	Haarsigte.	Florsigte.	Haarsigte.	Florsigte.	Haarsigte.	Florsigte.
strax	21,3	24,5	4,5	20,0	0	7,5
efter 10 Minuter	24,5	25,3	20,0	24,5	0	9,8
- 20 —	26,0	26,0	22,3	25,3	0	11,8
- 30 —	26,5	26,3	24,5	25,3	0	11,7
- 60 —	27,3	26,9	26,5	26,5	0,8	12,3

Det er derfor vigtigt at benytte Florsigte, naar man vil konstatere Dannelsen eller Forekomsten af ringere Mængder eller sprødere Gluten, idet Partiklerne heraf bortskylles gjennem Haarsigten, hvis de ikke let kunne forene sig til større sammenhængende Klumper eller Traade.

Dette vil yderligere belyses, naar man i de to følgende Tabeller betragter Kvægsølvtveklorets Indflydelse paa Glutenmængden. Forsøgene udførtes i begge Rækker saaledes: Portioner à 40 Gram Mel æltedes med Vædsken til Dej. Efter Henstanden udvaskedes Halvdelen over Flor-, den anden Halvdel over Haarsigte. Temperaturen var c. 20°, Vaskevandet var almindeligt Ledningsvand. Tallene betyde det samme som i den sidst nævnte Tabel.

I. Af Mel, som med 50 % Vand efter 20 Minuters Henstand gav 29,5 % Gluten, vandtes i samme Tid:

Dejen tilberedt med:	50 % Vædske til Dej		75 % Vædske til Dej.		Anmærkninger.
	Haarsigte.	Florsigte.	Haarsigte.	Florsigte.	
Sublimatopløsning 0,1 %	29	29	12,5	25	omtrent som normalt Gluten.
— 0,2 %	26	28	13	25	noget grynet og »kort«.
— 0,4 %	25	28	0	6	meget grynet og »kort«.

II. Af Mel, der med 50 % Vand i 20 Minuter gav 28 % Gluten, vandtes:

Dejen tilberedt med 50 % Vædske.	Henstand i 20 Minuter.		Henstand i 20 Timer.	
	Haarsigte.	Florsigte.	Haarsigte.	Florsigte.
Sublimatopløsning 0,2 %	26	26	2	15
— 0,4 %	20	25	1	11
— 1 %	13	19	0	0

Glutenet (fra II), vundet ved tidlig Udvaskning, havde ved Anvendelse af 0,2 %'s Sublimatopløsning omtrent normalt Glutens Konsistens (og 62 % Vand); ved 0,4 % Sublimat var Glutenet meget »kort« og ved 1 % Sublimat meget usammenhængende og vanskeligt at samle. Efter 20 Timers Henstand var det, selv ved kun 0,2 % Sublimat, temmelig svært at »samle« Glutenet ved Udvaskningen, det opnaaedes jo ogsaa kun ufuldkomment. Ved Anvendelse af 0,4 % Sublimat var Glutenet tørt og usammenhængende (Vandmængden c. 60 %); ved 1 % Sublimat tilbageholdt Florsigten en Smule graat Pulver.

I tynde Opløsninger virker Sublimatet altsaa først efterhaanden nedsættende paa Glutenudbyttet; stærkere Opløsninger have vel strax nogen Virkning, men denne forøges betydeligt ved Dejens Henstand. Derfor synes den Antagelse simplest, at Sublimatet virker ved efterhaanden at »garve« de i færdig Tilstand tilstedeværende Glutenpartikler, saaledes som det jo alene kan være Tilfældet for kunstigt Mels Vedkommende.

Ganske vist bevise de anførte Forsøg endnu ikke Umuligheden af et Ferments Medvirkning ved Glutendannelsen; men de gjøre dog i hvert Tilfælde Fermenthypothesen ganske overflødig. Dog, én Gang opstillede, kunne slige Hypotheser være meget sejlivede. Det er derfor maaske ikke unyttigt at skildre, hvorledes alle de Forhold ved Glutentilberedningen, der synes at tale for Fermentet, lade sig forklare uden Hensyn til et saadant[1]).

Hvad saaledes først angaar Bischoff & Weyl's Angivelse, at Melet taber sin Gluten givende Evne, naar det i nogen Tid holdes opvarmet ved 60°, da bekræftes denne Iagttagelse ingenlunde af andre Undersøgelser[2]), ligesom heller ikke jeg har fundet lavere Gluten-Udbytte efter en slig Behandling. Der findes iøvrigt med Hensyn til Varmens Indflydelse paa det tørre Mel ganske modstridende Angivelser. Medens saaledes Peligot[3]) angiver, at Tørring ved 120° (!) kun forringede Gluten-Udbyttet fra 9 % (tørt Gl.) til 7,5 % — naar Dejen blot blev hensat længere Tid end normalt (c. 12 Timer) —, saa fandt derimod i alle de ved Assistent Gram udførte Forsøg en betydelig Formindskelse af Glutenudbyttet Sted, naar Melet holdtes opvarmet ved 100° i 2—20 Timer. Forskjellige Melprøver forholdt sig dog noget forskjelligt; medens saaledes f. Ex. én Prøve efter 20 Timers Ophedning gav c. 1/3 af det normale Udbytte, vandtes af en anden Prøve, behandlet paa samme Maade, slet intet Gluten. Ja, denne Prøve gav efter kun 2 Timers Opvarmning ved 100° blot 1/11 af det normale Udbytte. Mine Forsøg vise ligeledes en stor Forskjel mellem Prøverne; i ét Tilfælde mistede Melet ganske Evnen

[1]) At man af Hvedemel, ved Behandling med ikke for stærk Vinaand, kan udtrække visse Glutenbestanddele, beviser paa Forhaand intet mod et Ferments Nærværelse. Her bringes i Erindring, at Emulsinets Virkning paa Amygdalin ikke ophæves af Vinaand under c. 35 %. (Wernitz, Ueber die Wirkung der Antiseptica auf ungeformte Fermente. Dissert. Dorpat 1880. p. 24).

[2]) Gottliebs Angivelser (p. d. anf. Sted S. 384) synes at være rent refererende.

[3]) Annales de chim. et de phys. 3. série, T. 29. p. 22.

til at give Gluten efter 20 Timers Opvarmning (100°), i andre Tilfælde var Tabet langt ringere.

Hvorpaa disse Forskjelligheder bero, maa foreløbig staa uafgjort. Selve Tørringen af Melet virker ikke nedsættende paa Gluten-Udbyttet, hvilket ses deraf, at Melprøver, tørrede ved flere Ugers Henstand over Svovlsyre, saa at Vandindholdet var højst 0,5 à 1 %, gave ganske den samme Mængde Gluten som normalt, naar den tilberedte Dej blot indeholdt den almindelige Vandmængde. Efter Tørring i Exsiccator virker iøvrigt Ophedning til 100° næppe nedsættende paa Gluten - Udbyttet; da jeg imidlertid ikke paany har været saa heldig at træffe en Melprøve, der ganske tabte sin Gluten givende Evne ved Ophedning, tør jeg ikke paastaa, at det altid er en større Vandrigdom (?), der gjør en Melprøve mere følsom. Exempelvis anføres her et Forsøg, der ganske vist giver Antydning i denne Retning.

100 Gram friskt Mel, Vandindhold 14,1 %, hensattes over Svovlsyre fra den 21/12 86 — 13/1 87 og vejede da 86,5 Gram; Tab 13,5 % Vand. Vandmængden i dette Mel bestemtes: 0,50 %. To Portioner, à 20 Gram, af det friske Mel hensattes i Tørreovnen (Vandbad) ved 97—99°, sammen med to tilsvarende Portioner (à 17,3 Gram) af det tørrede. Efter 3, resp. 24 Timers Ophedning, udtoges Prøverne. Efter at de vare afkølede, tilberedtes Dej, svarende til 20 Gram frisk Mel + 10 Gram Vand. Udvaskningen foretoges efter ½ Times Henstand. Resultatet ses af Tabellen.

	Friskt Mel.		Exsiccatortørret Mel.	
	% Vand i Melet.	% Gluten.	% Vand i Melet.	% Gluten.
Melet ikke opvarmet	14,1	31	0,5	30,5
Opvarmet i 3 Timer	0,6	24	0,5	29,5
— i 24 —	0	22,5	0,5 (?)	30,5

At alle disse Forhold søges forklarede ved begyndende Koagulationsfænomener o. l. ved Melprøvernes Proteïnstoffer, turde være fuldt saa berettiget som at formode et Ferments Nærværelse.

Stærke Saltopløsningers Virkning forklares simplest ved, at Glutenpartiklerne ikke bulne ud i disse Opløsninger;

derfor kunne de i Melet spredte Smaadele ikke klæbe sammen og samles til én Masse[1]).

Temperaturens Indflydelse ved selve Tilberedningen af Glutenet er ej heller vanskelig at forstaa uden Hensyn til noget Ferment. I Kulden sker Udblødningen af Proteïnstofpartiklerne meget langsomt — tilsvarende Forhold kjendes godt fra Spiringens Fysiologi —, og Partiklernes Volumen, saa vel som deres Klæbrighed, bliver herved betydelig mindre. Smaadelene forenes ikke, men skylles bort gjennem Sigten, hvis Finhed ogsaa her spiller en Rolle. I Heden ser man tydeligt, at Proteïnpartiklerne »skilles ad« eller rettere, at de ikke saa godt klæbe sammen. Om det er begyndende Koagulationsfænomener, en betydelig Opløsning især af »Plantelimen«, eller begge Forhold, der fremkalde Resultatet, er ikke afgjort. Med Varmen stiger ogsaa den skadelige Indflydelse af meget Vand til Dejen, især hos »kunstigt Mel«, der jo er mere følsomt end naturligt Mel, da dets Glutendele ere mindre klæbrige. Exempelvis anføres:

Kunstigt Mel, Dejen henstod 1/2 Time. Udvaskningen over Haarsigte.

Temperatur.	Dejen tilberedt med	
	60 % Vand.	70 % Vand.
19°	32,8 % Gluten	—
25°	—	34 % Gluten
35°	36 % Gluten	0 % -

Hvad angaar Virkningen af Dejens Henstand, da forstaas den ogsaa let af den større Udblødningsgrad (Klæbrighed), som Glutenpartiklerne opnaa ved Dejens længere Henstand, et Forhold, der ogsaa tydeligt giver sig til Kjende ved den større Vandrigdom hos Gluten, vundet efter Dejens længere Henstand (sml. denne Afhdl. S. 334—35).

Den uheldige Indflydelse, som en altfor rigelig Vandmængde i Dejen udøver, en Indflydelse, der, som anført S. 343, forøges ved Anvendelsen af grovere Sigte, forklares ligeledes rent

---

[1]) Jfr. Gottliebs Forsøg med ulige stærke Glycerinopløsninger, samt hans Udvaskningsforsøg (p. d. anf. Sted S. 387—388). Nærmere om forskjellige Saltes o. a. Virkning paa Gluten ses hos Balland, Journal de pharm. et de chim., 5. série T. 8, 1883 p. 360 og 438.

mekanisk. Helt bortsét fra den utvivlsomt betydeligere Opløsning af »Plantelim«, vil den større Vandmængde vanskeliggjøre Glutenpartiklernes Forening til én, Stivelsekornene omspændende, Masse. Thi ikke alene fjernes Partiklerne længere fra hverandre; men under Æltningen blive de fremkomne isolerede Smaaklumper udvaskede hver for sig, hvorved deres Volumen aftager meget betydeligt og Sammensmeltningen selvfølgelig yderligere besværliggjøres. Fig. 1 illustrerer dette Forhold. To Portioner Mel udrørtes med henholdsvis 50 og 100 Procent Vand, der var farvet med Methylviolet, hvorpaa en Del af Dejprøverne æltedes og udtværedes mellem to Glasplader. Da Farvestoffet som bekjendt fixeres af de uopløste Æggehvidestoffer, var det let at iagttage Forskjellen mellem de to Dejprøvers Struktur, især efter en ringe Udskylning. Medens Glutenet af den med 50 % tilberedte Dej omspændte Stivelsen og dannede store sammenhængende, men mindre rene Klumper (venstre Side i Fig.), saas Glutenet af den vandrige Prøve at være adskilt i mange smaa, langt renere, paa Grund af Rulningen mellem Glaspladerne pølseformede Klumper (højre Side i Fig.), der laa frit mellem de ikke farvede Stivelsekorn o. a. Smaadele. Det er klart, at Tabet ved Bortskylning og Opløsning maa være langt større ved Udvaskningen af denne end ved den vandfattigere Dej, samt at Sigtens Finhed maa spille en stor Rolle (sml. S. 343).



Fig. 1.

I det ved Fig. 1 illustrerede Exempel er valgt den største og den laveste af de anvendte Vandmængder, ved de mellemliggende Værdier iagttages Overgangsformer.

Ligesom man med meget Vand fortynder Dejen, saaledes kan man »fortynde« Melet med Stivelse, og man opnaar da en lignende Virkning: Glutenpartiklernes Fjernelse fra hverandre, større Bortskylningstab, ja endog fuldstændig Bortskylning. Blander man derimod godt, glutenrigt Mel med Bygmel eller Mel, der, f. Ex. ved Ophedning, har tabt sin Gluten givende Evne, saa kan det gode Mels Gluten ved Æltningen omfatte og sammenbinde de uopløste Proteinstof-Partikler i de tilsatte Melsorter, og derved kan da vindes et langt større Udbytte. Saaledes forklares de S. 341 omtalte Forsøg simplest. Her skal ogsaa erindres, at Balland, for at uddrage »Gluten« af findelte Klid, ælter disse med en friskt tilberedt Glutenklump, der da efter ny Udvaskning

er tiltaget betydeligt i Vægt[1]). Alle disse Fremtoninger forstaas let uden Fermenthypothesen, ja denne vilde her ikke engang være tilstrækkelig til Forklaring.

Fortyndede Syrer og Alkalier ville alt efter Koncentrationen hurtigere eller langsommere opløse Glutenet og alene af den Grund hindre Dannelsen af en sammenhængende Klump; Antagelsen af en ødelæggende Virkning paa et Ferment behøves ingenlunde.

Hypothesen om et Gluten dannende Ferment er altsaa ganske overflødig; man er berettiget til at betragte Glutenet som færdigt dannet i Hvedemelet, lige saa vel som Stivelsen, hvad fuldt ud bekræftes af de mikroskopiske Undersøgelser, der meddeles i det følgende Afsnit.

II.

Det er i Hvedekornets Frøhvide (»Melkjærnen«), at man kan vente at finde Glutenets Plads. I Skallen findes ikke andet Æggehvidestof end hvad der indprægnerer de fortørrede Cellevægge; i Kimen ere de betydelige Mængder med Fedt gjennemtrængte Æggehvidestoffer, der udgjøre Hovedbestanddelen af Cellernes Indhold, kun lidet klæbrige ved Udbulning i Vand, saaledes at Dannelsen af en Glutenklump ikke lader sig udføre ved Hjælp af Kimen alene. Da denne tilmed kun udgjør c. 1,5 % af Hvedekornets Vægt og for største Delen gaar over i Kliden, kan den ikke spille nogen væsentlig Rolle ved Glutenfremstillingen.

Hvedens Frøhvide (sml. Fig. 2) bestaar af ét sammenhængende Hele, et eneste System af Celler, der ikke staa i organisk Forbindelse med de andre af Kornets Væv. Frøhvidens yderste Lag Celler udmærke sig ved tykke Vægge, meget tydelige Cellekjærner og et andet Indhold, end de indre Celler. Disse periferiske Celler have spillet en vis Rolle i Glutenets Historie; de betegnes oftest »Glutenceller«, og det er endnu en temmelig almindelig Opfattelse, at Glutenet findes i disse Celler, trods de forskjellige Indvendinger, der ere blevne gjorte herimod. Det er derfor neppe overflødigt atter at omtale Oprindelsen til og det urigtige i denne Opfattelse, saa meget mere, som Sagen har en vis Interesse ogsaa for Spørgsmaalet om Klidens Næringsværdi.

---

[1]) Journ. de pharm. et de chim. 5. série. T. 11 p. 76. Denne Methode er dog af tvivlsomt Værd.

Forinden de seneste Decenniers Undersøgelser over Planternes kvælstofholdige Bestanddele havde begyndt at adskille de forskjellige Proteïnstoffer, Amidoforbindelser o. s. v. fra hverandre, gjaldt saa at sige al kvælstofholdig Substans i Planten for Æggehvidestof — det var jo ogsaa med denne Opfattelse, at man troede at kunne bestemme et Stofs Næringsværdi ved at bestemme Kvælstofmængden —, og Glutenet, opfattet som et enkelt Stof, betragtedes da som Type for Planternes Proteïnstoffer[1]), ligesom Hønse-Æggehviden har været det for Dyrenes. Da nu kemiske Analyser havde vist, at Klidene vare rige paa kvælstofholdige Stoffer, der altsaa sattes lig med Gluten, førtes man ganske naturligt til at betragte de periferiske Celler, der jo for største Delen gaa over i Kliden, som særlig rige paa »Gluten«. Og da Botanikeren Th. Hartig i Halvtredserne opdagede de saakaldte Proteïnkorn[2]), der navnlig let iagttages i olieholdige Frø — hvilken Opdagelse førte ham til den overilede Slutning, at alt i Frøene opmagasineret Proteïnstof var til Stede som slige Korn —, fik Kornene bl. a. Navnet »Klebermehl«, d. e. »Glutenmel«, et Navn, der altsaa bærer Mærke af hele to Anskuelser, 1) at Frøs Proteïnstof er ligt Gluten, og 2) at dette Gluten kun findes i Form af smaa Korn. Saadanne Navne, der »betyde noget«, ere som bekjendt de bedste Ankere for urigtige

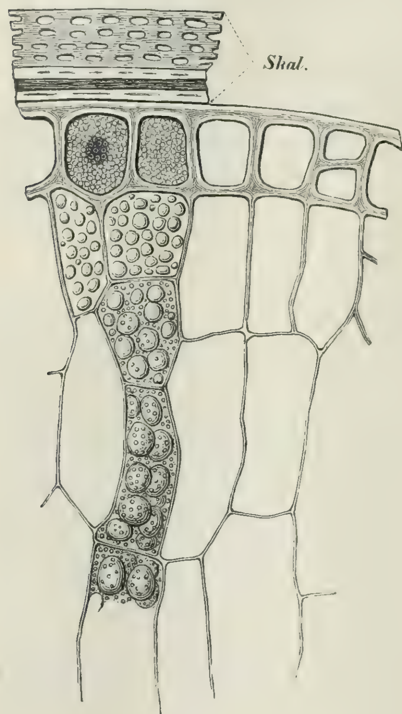


Fig. 2. Tværsnit af et Hvedekorn. Brudstykke c. 250/1.

1) I Forbindelse hermed staar utvivlsomt den udbredte, men urigtige Anskuelse, at Gluten kan vindes af andre Frøsorter end Hveden.

2) Botanische Zeitung 1855 & 1856. Hovedafhandlingen findes i Hartig: Entwickelung des Pflanzenkims. 1858.

Theorier[1]); der er faa Betegnelser, der i en simpel Sag have afstedkommet større Forvirring end just »Klebermehl« i Spørgsmaalet om Kornsorternes og i det Hele Frøenes Oplagsnæring.

Da Hartig nemlig i det nævnte yderste Lag Frøhvideceller, i Modsætning til de indre, mente at finde en Mængde smaa, men tydelige og meget resistente Proteïnkorn, hvilket stemmede godt med Klidanalyserne, saa fik disse Celler i den tyske Litteratur efterhaanden Navnet »Kleberzellen« eller »Kleberschicht«, hos os »Glutenceller« og »Glutenlag«, og herved støttes uvilkaarligt den Anskuelse, at Glutenet har sin Plads i disse Celler.

Men dette er ganske urigtigt. Der har stedse været Stemmer, der hævdede den Opfattelse, at Glutenet ikke findes i de nævnte, men i de indre Frøhvideceller. Den vigtigste herhen hørende Litteratur er nævnt i min Afhandling om Byggens Frøhvide[2]); siden dennes Publikation har navnlig Aimé Girard[3]) drøftet Sagen. Da imidlertid de af denne Forfatter, saa vel som af de ældre, anvendte Methoder ved den mikroskopiske Undersøgelse give urigtige Resultater, idet bl. a. Proteïnkornene ødelægges, skal jeg henvise til min nys nævnte Undersøgelse, der viser, at Cellerne indeholde, foruden Kjærnen, smaa yderst lidet resistente Proteïnkorn (de af Hartig nævnte og ved almindelig Præparation i Vand iagttagne Korn, der sædvanlig holdes for Proteïnkorn, ere Fedtdraaber), der ligge indlejrede i en blød, med Fedt gjennemtrængt plasmatisk Grundmasse. Gluten kan ikke fremstilles af disse Cellers Indhold, der ved Behandling med Vand adskilles i Smaapartikler. Iøvrigt gaar, som sagt, disse Celler for største Delen over i Kliden.

Men Glutenet findes, hvad allerede Payen[4]) angav, i de indre Celler. Fig. 2 viser, hvorledes de nærmest det periferiske Lag liggende Celler ere mindre end de dybere inde værende; endvidere ses, at Stivelsekornene i de ydre Celler ere af Middelstørrelse og ligge mere isolerede, medens de i de indre Cellelag ere stillede langt tættere sammen og forekomme baade som meget store og som ganske smaa Korn. Gjennem hele Frøhviden ere Stivelsekornene indlejrede i den indtørrede Celleslim, ganske som

---

[1]) Interessante Oplysninger om dette Forhold findes i Tegnérs lille Bog: Språkets makt öfver tanken. Stockholm 1880.

[2]) »Meddelelser« Bd. 2, 3 Hefte, 1884 p. 118—120.

[3]) Annales de chimie et de physique. 6me série, T. 3. 1884. p. 289—355.

[4]) Paa det anførte Sted p. 12. Payens Figurer findes i T. 8, 1844.

hos Byg; men, medens denne »Grundmasse« er meget mægtig i de mod Omkredsen liggende Lag, bliver den spinklere og spinklere indad mod Kornets Midte.

Det er just denne Grundmasse, der indeholder Glutenet. Udpræpareres nogle af de Stivelse førende Celler, f. Ex. ved tangentiale Snit fra Kornets hvælvede Side, i tør Tilstand paa et Objektglas, da kan man let iagttage Dannelsen af Glutenklumper, naar man udtværer Cellernes Indhold i en Vanddraabe. Fig. 3 viser dette; man sér Stivelsekornene ligge mere eller mindre frit, medens Celleslimen — bortset fra de opløste Stoffer — er bleven til klæbrige, seje Masser og Traade af Gluten. Behandles andre Frøsorter paa denne Maade opstaar intet Gluten. Den øjeblikkelige Indtræden af Reaktionen synes at være et yderligere Bevis for, at Gluten virkelig er færdigt dannet tilstede; i modsat Fald maatte man antage, at Fermentet var fordelt jevnt i selve de Partikler, der blive til Gluten. Men efter alt, hvad der vides om kemiske Fermenter i hvilende Organer, synes de stedse at være lokaliserede andensteds end de Stoffer, de paavirke[1]). — Ved Præparationer af de inderst inde i Kornet liggende Celler synes denne Glutendannelse ikke saa let at ske, Celleslimen er her mindre klæbrig.

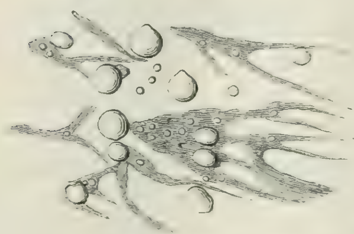


Fig. 3. c. 250/1.

Efter alt, hvad der foreligger, kan det altsaa siges, at Glutenet udgjør Hovedmassen af Celleslimen i Hvedekornets Stivelse førende Frøhvideceller.

Angaaende de med Urette saakaldte »Glutenceller« — et Navn, der burde opgives — har Mège-Mouriès[2]) nogle mærkelige Angivelser, som i nyeste Tid, særlig af Girard (p. d. anf. Sted) ere blevne prøvede paany og delvis bekræftede. Mège-Mouriès, der især i Halvtredserne arbejdede ivrigt for at indføre

[1]) Om diastatiske Fermenter i Kornet vil der nedenfor blive Tale. I bittre Mandler findes Emulsinet og Amygdalinet i forskjellige Væv, hvad det er lykkedes mig at paavise. Udførligt herom er meddelt i »Botanisk Tidsskrift« Bd. 16, S. 222.

[2]) Compt. rend. T. 37. 1853. p. 351, p. 427 og p. 775; T. 38. 1854 p. 505.

de af ham foreslaaede Brødtilvirkningsmethoder, gjorde den Iagttagelse, at Kliden, eller rettere de nævnte Celler, indeholder et diastatisk Ferment. I Dej af klidholdigt Mel skal dette Ferment, ved at opløse og omdanne Stivelsen, bidrage til at fremkalde den hos Klidbrød saa vel kjendte Klæghed, medens derimod Stivelsen i det sigtede Mel — just paa Grund af de periferiske Frøhvidecellers næsten fuldstændige Fjærnelse — omdannes i langt ringere Grad under Dejens Tilberedning.

Men Mège-Mouriès overdrev Virkningen af disse Cellers Indhold, som han tillige tilskrev Egenskab af Mælkesyre-Ferment m. m., en Fejl, der havde sin naturlige Grund i den Tids mangelfulde Kjendskab til Bakteriernes hele Færd.

Balland[1]) har ved sine Studier mærkeligt nok ikke ganske undgaaet disse Skjær, idet han tilskriver selve Kornet (der siges: »en dehors de toutes causes extérieures«) et Gluten omdannende »uopløseligt« Ferment — d. v. s. altsaa en Organisme —, som han mener findes i de periferiske Frøhvideceller (»les membranes qui entourent l'embryon«), der, som oftere sagt, for en væsentlig Del gjenfindes i Kliden. Idet jeg med Hensyn til videre Detailler henviser til Ballands Publikationer, skal et af hans Forsøg anføres som Exempel.

100 Gram »gamle Klid« blev revet i 10 Minutter med 250 Gram koldt Vand; derpaa blev det hele presset i et Klæde. Den udvundne Vædske blev strax anvendt til at tilberede Dej af godt Mel. Efter 1/2 Times Henstand vandtes da 22 % Gluten; efter 2 Timers Henstand kun 14 %. Samme Mel, bragt til Dej med rent Vand, gav i samme Tidsrum henholdsvis 28 og 29 % Gluten.

Jeg har nu med Anvendelse af ganske friske Klid (fra de forenede Dampmøller) saa vel som med flere Prøver Handelsklid oftere gjentaget disse Forsøg, men aldrig faaet ringere Gluten-Udbytte, selv efter 24 Timers Henstand[2]). Var derimod Klidudtrækket blevet surt ved Henstand i et tillukket Glas i 2 à 3 Dage, saa vandtes kjendeligt mindre, resp. intet Gluten, saaledes som det fremgaar af følgende, exempelvis anførte Forsøg.

---

[1]) Paa det anførte Sted. T. 8. p. 501, og T. 12. p. 158.

[2]) Derimod vandtes i nogle Tilfælde større Glutenudbytte, aabenbart idet opslemmede eller opløste Proteïnstoffer fra Kliden have adderet sig til det i Melet værende Gluten. Exempel: 40 Gram Mel gav med 20 Cc. Vand efter 2 1/2 Times Henstand: 11,5 Gram Gluten; med Klidudtræk vandtes 12,7 Gram. Sml. Anm. 1, S. 340.

Tre Prøver à 50 Gram Mel æltedes til Dej med 25 Cc. Vædske, henholdsvis Vand, friskt Klidudtræk og surt Klidudtræk (3 Dage gammelt). Efter 2 Timers Henstand udvaskedes Halvdelen af hver Dejklump, efter 20 Timer Resten. Der vandtes:

Dej tilberedt med	efter 2 Timers Henstand	efter 20 Timers Henstand
Vand	7,3 Gram Gluten	7,7 Gram Gluten
friskt Klidudtræk	7,7 — —	7,8 — —
surt Klidudtræk	5,6 — —	0 — —

At det ikke er den i Klidudtrækket dannede Syre (alene), der virker nedsættende paa Glutenudbyttet, fremgaar af følgende, ligeledes exempelvis anførte Forsøgsrække.

Anvendt samme Mel som i sidst nævnte Forsøg og et to Dage gammelt, surt Klidudtræk. En Del af dette blev filtreret gjennem to Lag Papir, en anden Del ophedet 2 Timer til 100° i et tilsmeltet Rør og atter afkølet.

Der vandtes af 25 Gram Mel:

Dej tilberedt med	efter 2 Timers Henstand	efter 20 Timers Henstand
ufiltreret Klidudtræk	7,8 Gram Gluten	0 Gram Gluten
filtreret —	7,8 — —	4,0 — —
Vand, hvori opslemmet Residuet fra Filtrering af 50 Cc. Udtræk	7,7 — —	0 — —
steriliseret Klidudtræk	ikke prøvet	8,2 — —

Idet Spørgsmaalet om Syrers Virkning ikke her skal forfølges, vende vi os til Balland for at pointere, hvad der her er af Vigtighed, nemlig, at der ikke i selve Kornets Væv findes noget stærkt virkende Gluten omdannende Ferment[1]), være sig opløseligt eller uopløseligt, men at de Iagttagelser, som Balland har gjort, maa føres tilbage til Bakterier, der hænge ved Kornets Skal, i dets Furer o. s. v., — kort sagt ikke vedkomme Kornet som saadant.

[1]) Fra de ringe Mængder peptoniserende Ferment, der dannes under Spiringen og muligvis under Hvilen findes i yderst smaa Mængder, kunne vi her se bort.

At de ved Kornet hængende Organismer spille en meget betydelig Rolle ved den frivillige Brodgjæring, fremgaar bl. a. af Laurents Studier, til hvilke her kun skal henvises[1]).

De periferiske Frøhvideceller indeholde altsaa, ifølge det meddelte, ikke Gluten og ej heller noget Gluten omdannende Ferment, men Proteïnkorn, lejrede i en Grundmasse af fedtrigt Protoplasma. Deres mest mærkelige Indhold er dog det diastatiske Ferment, om hvis Lokalisation i disse Celler og i Kimen der, efter Girards Forsøg, ikke længer er Tvivl. Ved at aabne og udfolde udblødte Hvedekorn, kan man uden Vanskelighed isolere de Stivelse førende Frøhvideceller samt Kimen, og det er da let at vise, at der ikke findes nogen — eller dog kun yderst svag — diastatisk Fermentevne i selve de Stivelse førende Celler, medens Kimen saa vel som de fra den egentlige Skal befriede periferiske Frøhvideceller have en meget betydelig Fermentevne. Vil man derfor have et særligt Navn for de nævnte Celler — og et urigtigt Navn fjernes bedst ved en ny Betegnelse —, saa ligger det nær at give dem Navnet Ferment-Celler.

Fermentcellernes Rolle ved Spiringen, bortset fra deres Indhold af Oplagsnæring[2]), vil ventelig staa i Forbindelse med Indholdet af Diastase. I denne Sammenhæng skal anføres Tangl's Undersøgelser af Græsfrugternes Frøhvide[3]), der førte til Paavisning af yderst fine Forbindelsestraade mellem de nævnte Celler og den indre Del af Frøhviden. Disse Forbindelsestraade ere imidlertid her af en saa særdeles delikat Natur, at de hidtil undgik Iagttagernes Blik, selv hvor de vare eftersøgte, og kun ved særlige Fremgangsmaader tydeliggjøres. Paa Grund af denne umaadelige Smalhed turde de næppe have den direkte Betydning for Stofvandring, som enkelte Forfattere (navnlig de Vries) mene at kunne tilskrive Nabocellers Forbindelsestraade i Almindelighed. De omtalte fine Traade opfattes her vel rettest som Levninger fra Frøhvidens yngste Stadier, Kjærnedelings-

[1]) Les microbes boulangers. Bull. de la soc. royale de Belgique. T. 24, 2me partie 1885.

[2]) Ved Spiringen opløses ikke alene Indholdet, men ogsaa de tykke, paa Cellestof rige Vægge svinde ind til tynde Hinder, idet Cellerne løsne sig fra hverandre og afrunde sig.

[3]) Sitzungsberichte d. k. Akad. d. Wiss., Bd. 92, 1 Abt. Wien 1885, Juli.

perioden. Derimod kunne, hvad ogsaa Tangl's Iagttagelser tyde paa, de fine Traade utvivlsomt lette Opløsningen af de gjennemsatte Vægge og derved indirekte faa Betydning for Stofvandring, i nærværende Tilfælde altsaa bl. a. for Ledning af Ferment til de Stivelse førende Celler. Om disse Forhold vides dog intet sikkert.

Maj 1887.

Carlsberg Laboratoriet.

April 1888 (Fortsættelse; see 1. Bind, Side 455).

Laboratoriets Bestyrelse bestaaer for Tiden af: Professor Barfoed, Formand, Professor Jørgensen, Brygger Kogsbølle, Direktør Kühle og Etatsraad Steenstrup. — Af dens tidligere Medlemmer afgik Professor Panum, som var gjenvalgt 1884, ved Døden 2. Maj 1885, og Kaptajn Jacobsen, som var gjenvalgt 1886, ligesaa 30. April 1887 under et Ophold i Rom. Til at indtræde i Bestyrelsen i deres Sted valgte Videnskabernes Selskab 15. Maj 1885 Lektor, nu Professor, Dr. phil. S. M. Jørgensen og 14. Oktober 1887 Direktør ved Gl. Carlsberg Bryggeri Kaptain S. A. van der Aa Kühle. Professor Barfoed og Brygger Kogsbølle, hvis Funktionstid efter Fondets Statuter udløb 24. September 1886, gjenvalgtes begge af Videnskabernes Selskab 14. Maj s. A., og Førstnævnte gjenvalgtes derefter af Bestyrelsen til Formand.

Laboratoriets Forstandere ere: Hr. Joh. Kjeldahl for den kemiske Afdeling og Hr. Dr. phil. Emil Chr. Hansen for den fysiologiske Afdeling.

Laboratoriets nuværende Assistenter ere: i den fysiologiske Afdeling Hr. Cand. phil. J. C. Holm, ansat fra 15. September 1884, og i den kemiske Afdeling Hr. Cand. mag. R. Koefoed, fast ansat fra 1. Oktober 1887, efterat han Aaret iforvejen havde været midlertidigt antaget fra 1. Oktober til 31. December. — De tidligere Assistenter, Hr. L. Knudsen i den fysiologiske og Hr. Ph. Gram i den kemiske Afdeling byttede, efter eget Ønske og for at udvide deres Kundskaber, Plads 1. Januar 1884 og forbleve i deres nye Stillinger, indtil de traadte ud af Laboratoriets Tjeneste, Hr. Gram nemlig 31. Marts 1885 og Hr. Knudsen 31. August 1885. — Hr. W. Johannsen fratraadte sin Plads som Assistent i den kemiske Afdeling 30. September 1887. — Fremdeles har Hr. polyteknisk Kandidat J. G. Forchhammer været Assistent i den kemiske Afdeling fra 1. September 1885 til 31. August 1886, og Hr. polyteknisk Kandidat S. V. Poulsen ligesaa i den fysiologiske Afdeling fra 1. Maj 1885 til 31. December 1887.

Siden Aaret 1879 paalægges det enhver ny ansat Assistent at gjennemgaae et 3 Maaneders praktisk Kursus i Carlsbergs Bryggerier og tage Deel i de der forefaldende Arbejder, for derved at blive fortrolig med samtlige Bryggerioperationer og faae den praktiske Erfaring, hvortil de videnskabelige Undersøgelser i Laboratoriet skulle slutte sig.

Til Udvidelse af den fysiologiske Afdeling overlod Fondets Stifter i Sommeren 1884 Laboratoriet to Værelser, som ere beliggende oven over Afdelingens andre Lokaler, og lod dem paa sin Bekostning istandsætte og forsyne med de nødvendige Vand- og Gasledninger.

De bleve derefter monterede for Laboratoriets Regning og tagne i Brug i September s. A.

I Aaret 1884 bestemte Fondets Stifter endvidere, at et ham tilhørende Grundstykke paa 20000 Kvadr. Alen, beliggende ved Carlsbergvejen overfor Bryggeriet, skulde forbeholdes til, naar Laboratoriets Sparepenge engang kunde strække til, derpaa at opføre en ny Laboratoriumsbygning, som skulde træde i Stedet for den, som nu benyttes. Hans Ønske om at see et nyt og større Laboratorium afløse det ældre var imidlertid saa levende, at han i 1886 besluttede selv at ville bekoste Bygningen og at paabegynde Opførelsen af den i 1887. Efter den allerede i Efteraaret 1886, hvad alle Hovedpunkterne angik, færdigt liggende Plan skulde den have to Etager foruden Kjælder, 60 Al. Længde og 20 Al. Dybde, Varmeapparat o. s. v. i Kjælderen, kemisk Laboratorium i Stueetagen og en Deel af Kjælderen, fysiologisk Laboratorium, Bogværelse og en Direktionssal i Salsetagen. Han lod ogsaa derfor med Bekostning af omtrent 3000 Kr. i god Tid udføre et Kloakarbejde, men han opnaaede ikke at faae begyndt paa Bygningen, og efter hans Død har Opførelsen af den ikke kunnet finde Sted. Spørgsmaalet om et nyt Laboratorium staaer derfor atter paa samme Punkt som før 1886.

Til Instrumenter, Apparater og andet Inventarium af forskjellig Slags er i de sidste sex Regnskabsaar, 1. Oktober 1881—30. September 1887, tilsammen anvendt omtr. 16.300 Kr., og ligesaa til Bøger omtrent 1360 Kr. Den aarlige Udgift for Laboratoriet, deri indbefattet Lønninger til de ved Laboratoriet ansatte Mænd, Understøttelser til Studierejser og Udgivelse af „Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet“, har i de samme Regnskabsaar udgjort: i $18^{81}/_{82}$ 17575 Kr. 49 Øre, i $18^{82}/_{83}$ 18342 Kr. 60 Øre, i $18^{83}/_{84}$ 19840 Kr. 21 Øre, i $18^{84}/_{85}$ 24512 Kr. 6 Øre (heri indbefattet Udgiften for Monteringen af de ovennævnte nye Lokaler), i $18^{85}/_{86}$ 23177 Kr. 65 Øre, og i $18^{86}/_{87}$ 21646 Kr. 43 Øre.

Ved Udgangen af Regnskabsaaret $18^{86}/_{87}$ udgjorde Laboratoriets oplagte Sparepenge 68400 Kr.

Af de i det her omhandlede Tidsrum udgivne Hefter af „Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet“ er der ligesom af de tidligere uddelt omtrent 250 Exemplarer til Bibliotheker, Institutioner, Videnskabsmænd o. A. her hjemme og i Udlandet.

Medens den internationale Lægecongres afholdtes i Kjøbenhavn i August Maaned 1884, blev Laboratoriet besøgt af flere af Congressens fremragende Medlemmer, hvoriblandt Hr. L. Pasteur fra Paris. Baade før og efter den Tid have flere Videnskabsmænd og Bryggere fra Udlandet opholdt sig i kortere eller længere Tid ved Laboratoriet, for at gjøre sig nærmere bekjendte med de der anvendte Fremgangsmaader.

I November 1886 har „La société d'encouragement pour l'industrie nationale“ i Paris tilkjendt Hr. Dr. E. C. Hansen sin Guldmedaille som Anerkjendelse af hans fra Laboratoriet offentliggjorte Arbejder over Alkoholgjærsvampene og de derved opnaaede praktiske Resultater.

Table des matières du tome deuxième.

Cinquième livraison, 1888.

Erratum.

Page 10, ligne 11, au lieu de: $^7/_{200}$ lisez: $^1/_{14}$.

RÉSUMÉ DU COMPTE-RENDU

DES TRAVAUX

DU

LABORATOIRE DE CARLSBERG.

2me VOLUME, 1re LIVRAISON.

COPENHAGUE.

EN COMMISSION CHEZ H. HAGERUP.

IMPRIMERIE DE THIELE.

1883.

Prix: 0,20 Kr.

Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg.

Paraît par livraisons à des époques indéterminées. A mesure qu'il en paraîtra un nombre suffisant pour faire un volume, les abonnés recevront un titre imprimé en même temps qu'une table des matières, avec l'indication de la période qu'embrasse le volume.

Sur une nouvelle méthode de dosage de l'azote dans les substances organiques.

Par

J. Kjeldahl.

De tous les travaux analytiques, le dosage de l'azote dans les substances organiques est un de ceux qui se présentent le plus fréquemment, surtout comme étant le seul moyen assez exact jusqu'ici connu de déterminer la richesse en substances protéiques de différents produits végétaux, richesse qui, précisément, est souvent le meilleur criterium de leur valeur. L'analyse dont il s'agit n'a pas moins d'importance pour un grand nombre de recherches scientifiques, notamment celles qui ont pour objet des questions de physiologie. Mais les méthodes actuelles, qui toutes ont cela de commun que la substance à analyser, mélangée avec des ingrédients convenables, est brûlée dans un tube à combustion, exigent beaucoup de temps, une attention soutenue, une main exercée et un appareil assez compliqué. Comme ces opérations se font maintenant par milliers dans les nombreux laboratoires où l'on s'occupe de l'étude des substances organiques azotées, cette circonstance serait déjà un puissant motif pour essayer de trouver une méthode abrégée qui permît aux chimistes et aux physiologistes d'économiser une grande partie de leur temps. Mais on gagnerait encore davantage, si l'on réussissait à en rendre les manipulations assez simples pour qu'elle pût également devenir accessible aux personnes peu versées dans la chimie, car elle acquerrait alors pour l'industrie une importance que les autres méthodes, pour les raisons indiquées plus haut, n'ont pu avoir jusqu'ici qu'à un moindre degré.

Parmi les industries dans lesquelles l'analyse des substances organiques azotées joue un rôle particulièrement important, celle du brasseur occupe le premier rang. Aussi ai-je depuis longtemps eu à coeur de trouver une méthode de dosage de l'azote qui fût à la fois rapide, exacte et d'une exécution facile, et après m'être, pendant plusieurs mois, livré exclusivement à l'étude de cette question, j'ai été assez heureux pour la résoudre de façon à pouvoir offrir aujourd'hui

aux chimistes une méthode qui leur permettra, avec une exactitude suffisante et une rapidité surprenante, de doser l'azote dans presque toutes les substances organiques. Cette nouvelle méthode demande très peu d'habileté de la part de l'opérateur, et comme elle présente en outre beaucoup d'autres avantages, en partie très essentiels, sur lesquels j'aurai l'occasion de revenir plus loin, j'ose espérer que l'usage s'en répandra, surtout dans les recherches relatives à l'agriculture et à la physiologie.

Les manipulations relativement faciles qui caractérisent en géneral les analyses exécutées par la voie humide, devaient faire désirer qu'on cherchât à en étendre l'emploi à l'analyse élémentaire qui nous occupe; mais la circonstance qu'on ne peut guère, par ce procédé, exercer sur les substances organiques une action aussi énergique qu'il le faudrait pour les décomposer complètement en leurs éléments les plus simples, rendait ce problème assez difficile à résoudre. Même en employant l'hypermanganate de potasse, c-a-d. l'agent d'oxydation le plus puissant que nous possédions, la transformation est généralement incomplète, une partie seulement de la substance organique se décomposant en acide carbonique, eau et ammoniaque (l'azote libre apparaît rarement), tandis qu'une autre partie se transforme en certaines combinaisons très stables qui résistent à l'action de l'hypermanganate. Cette action est d'ailleurs très variable suivant les substances organiques sur lesquelles on opère, les unes ne s'oxydant que faiblement et les autres complètement. M. Wanklyn, qui, avec plusieurs collaborateurs, s'est principalement occupé de ce genre de recherches, a constaté que, par l'ébullition avec la potasse et l'hypermanganate de potasse, quelques substances abandonnaient tout leur azote à l'état d'ammoniaque, d'autres seulement la moitié ou une fraction différente, mais qui, pour chaque substance, était dans un rapport constant avec la quantité totale d'azote. Après avoir trouvé un pareil rapport commun pour le groupe des substances albuminoïdes, M. Wanklyn a fondé là-dessus une méthode pour le dosage de l'azote dans les matières végétales, méthode qui toutefois n'a guère eu de partisans hors de l'Angleterre. Les indications qu'il donne sur la quantité d'ammoniaque fournie par les substances albuminoïdes ne concordent en effet nullement entre elles, de même que sa manière particulière d'opérer avec quelques milligrammes de matière et sa détermination colorimétrique de l'ammoniaque ne trouveront guère d'emploi, si ce n'est lorsque les circonstances le demandent comme, par ex., dans les analyses de l'eau. Vu l'importance de cette question, spécialement pour le laboratoire de Carlsberg, j'ai, il y a quelques années, fait divers essais d'après la méthode de M. Wanklyn, mais en opérant sur une quantité assez grande pour que l'ammoniaque pût être dosée par les méthodes ordinaires. Or, la formation en a toujours été très incomplète, et, ce qui est pire, je n'ai obtenu que des résultats assez peu concordants.

Tandis que, dans toutes les recherches entreprises jusqu'ici, on s'est borné à étudier l'action de l'hypermanganate sur les substances organiques dans une dissolution alcaline, j'ai essayé de procéder à l'oxydation dans une dissolution acide, dans l'idée que l'ammoniaque

aurait alors une plus grande tendance à se former, et j'ai pu constater par une série d'expériences qu'on obtient en effet un meilleur résultat en traitant la dissolution bouillante, additionnée d'acide sulfurique étendu, par l'hypermanganate de potasse en excès, et en distillant ensuite après saturation avec la soude. Néanmoins, même par ce procédé, la transformation est tout à fait incomplète et résultats sont toujours incertains.

Mais les choses se passent tout autrement lorsqu'on chauffe fortement les substances organiques avec de l'acide sulfurique concentré, car elles se décomposent toutes pour ainsi dire sans exception en combinaisons qui, par une oxydation subséquente, abandonnent complètement leur azote à l'acide à l'état d'ammoniaque. Le principe de la nouvelle méthode consiste donc à chauffer pendant quelque temps la matière à analyser avec une forte proportion d'acide sulfurique concentré jusqu'à une température voisine du point d'ébullition de l'acide, et à oxyder la dissolution ainsi obtenue avec un excès d'hypermanganate de potasse sec en poudre. Dans ces conditions, l'azote des substances organiques, comme nous l'avons dit, se transforme complètement en sulfate d'ammoniaque, qui, l'oxydation une fois terminée et après saturation avec la soude, peut être distillé et dosé par les méthodes ordinaires.

Il va sans dire qu'une condition essentielle pour l'emploi de ce procédé, c'est que le sulfate d'ammoniaque ne subisse aucune décomposition à la haute température à laquelle on opère, ni surtout pendant le traitement subséquent par l'hypermanganate de potasse, traitement qui, dans les circonstances où on l'entreprend ici, est accompagné de phénomènes très violents. Mais plusieurs expériences m'ont fait voir qu'une pareille décomposition n'est pas à craindre. En voici un exemple: 0,0925 gr. de sulfate d'ammoniaque ont été chauffés pendant 4 heures avec 10 c. c. d'acide sulfurique concentré à une température voisine du point d'ébullition de l'acide. On a ensuite ajouté de l'hypermanganate de potasse, et en dosant l'ammoniaque par distillation, on en a obtenu une quantité correspondant à 0,0923 gr. de sulfate, par conséquent au poids primitif.

Je décrirai maintenant en peu de mots la marche très simple de l'analyse. La matière à analyser est pesée dans un petit flacon dont on a d'avance déterminé le poids, et c'est dans ce même flacon qu'elle est soumise aux divers traitements mentionnés plus haut, circonstance déjà assez commode lorsqu'on opère sur des corps solides, mais qui, on le voit facilement, simplifie singulièrement les manipulations quand il s'agit de doser l'azote dans des dissolutions. Qu'on se rapelle seulement tous les artifices auxquels, en pareil cas, il faut avoir recours avec l'ancienne méthode, comme par ex. l'évaporation dans les minces nacelles en verre de Hofmeister, qu'on pulvérise avec la substance à analyser et introduit avec elle dans le tube à combustion, l'évaporation sur une surface de mercure chauffé, dans des capsules en feuilles d'étain, etc. Quelque élégantes que puissent être plusieurs de ces méthodes, il est cependant évident que le mieux est de pouvoir s'en passer. Il n'y a plus ici de ces complications; on

n'a qu'à faire une pesée avec le flacon ou à y introduire avec une pipette un volume déterminé de liquide, puis quand, après un séjour dans l'étuve, l'eau s'est évaporée, on a justement l'extrait là où il faut l'avoir. Quant à la quantité de matiere qu'il convient le mieux de prendre pour une analyse, j'y reviendrai plus loin.

On ajoute ensuite un excès suffisant d'acide sulfurique concentré, excès qui certainement peut varier dans d'assez larges limites, mais que, pour plusieurs raisons, il convient de maintenir toujours invariable; j'ai ainsi constamment employé 10 c. c. d'acide dans mes expériences. Je conserve ce dernier dans un flacon dont le bouchon est muni d'une pipette de 10 c. c., qui, lorsqu'elle ne sert pas, est soigneusement fermée avec un bout de tube en caoutchouc et un bouchon en verre. Il faut surtout bien veiller à ce que l'acide n'absorbe point des vapeurs d'ammoniaque, car il est clair que ce danger est beaucoup plus à craindre ici qu'avec la chaux sodique et que, si une pareille absorption a eu lieu, elle est sans remède. Il est toutefois facile de se mettre complètement à l'abri de cet accident, même si l'acide séjourne plusieurs mois dans le laboratoire; cependant, comme mesure de précaution, j'ai toujours eu soin, en entreprenant une série d'analyses, de les accompagner d'une analyse de contrôle faite sur 10 c. c. d'acide seul ou mélangé avec un peu de sucre pur, et absolument dans les mêmes conditions que les autres, avec addition d'hypermanganate de potasse, saturation avec la soude et distillation. Cette analyse de contrôle donne quelquefois zéro d'azote, mais l'acide pur du commerce renferme souvent une petite trace d'ammoniaque, et, dans ce cas, il faut faire subir une correction aux autres analyses.

Le flacon est alors placé sur une toile métallique au-dessus d'une petite flamme de gaz. En général, le contenu en devient d'abord noir et poisseux; puis, la température augmentant, il se produit une vive réaction accompagnée d'un grand dégagement de gaz, pendant lequel la matière se dissout complètement. Comme il se dégage alors en abondance de l'acide sulfureux et des vapeurs blanches, cette opération doit se faire dans une cage vitrée bien ventilée. Il est bon aussi, tant que dure le dégagement, de donner au flacon une position inclinée, le liquide, pendant cette période, rejaillissant ordinairement contre ses parois. Le flacon doit avoir une, contenance de 100 c. c. et être muni d'un col assez long et étroit; il faut aussi qu'il soit en état de résister à l'action de l'acide concentré et brûlant, mais, à cet égard, on observe de très grandes différences suivant les diverses espèces de verre. En continuant le chauffage, les vapeurs condensées de l'acide nettoient les parois du flacon et ramènent dans le liquide les particules charbonnées qui y étaient adhérentes.

Après que le dégagement des gaz a pris fin, l'action de l'acide sulfurique semble aussi être épuisée. Mais qu'il ne cesse, au contraire, d'exercer une lente action oxydante, c'est ce que montrent les changements de coloration qui se produisent pendant qu'on continue à chauffer. Le liquide passe en effet du noir au brun foncé pour devenir ensuite brun clair, jaune clair et enfin, si l'acide agit pendant un temps suffisant, complètement incolore et limpide. Pour

obtenir ce résultat, il est vrai, il faut en général chauffer très longtemps si l'on opère seulement avec de l'acide concentré; mais on peut y arriver beaucoup plus vite en mélangeant ce dernier avec un peu d'acide fumant et surtout en y ajoutant de l'acide phosphorique anhydre. Avec un pareil mélange d'acide sulfurique monohydraté et d'acide phosphorique anhydre, il suffit d'ordinaire de chauffer pendant deux heures pour avoir une dissolution brun claire et limpide. J'ai du reste constaté qu'il n'est le plus souvent pas nécessaire de pousser si loin le chauffage; du moins, en ce qui concerne les substances albuminoïdes et leurs dérivés, c'est-à-dire les corps auxquels ma méthode s'appliquera dans le plus grand nombre de cas, on obtiendra tout autant d'ammoniaque en oxydant un mélange encore noir, chauffé pendant 2 heures seulement avec de l'acide sulfurique concentré, qu'en pratiquant cette oxydation dans un liquide presque décoloré, obtenu par un chauffage de plusieurs heures avec de l'acide sulfurique monohydraté additionné d'acide phosphorique anhydre. Par contre, comme nous le verrons plus bas, il y a d'autres substances qui retiennent avec force leur azote, et pour celles-là il sera bon de choisir le procédé avec l'acide phosphorique anhydre, car, dans la décoloration du liquide, on aura toujours une preuve certaine que l'action de l'acide sulfurique a pris fin.

Le chauffage, avons-nous dit, doit être conduit de façon que la température se rapproche du point d'ébullition de l'acide, ce qu'on reconnaît à ce que, de temps à autre, il se produit de petits soubresauts dans le liquide. Le maintien de cette température ne présente pas la moindre difficulté et les analyses n'exigent aucune surveillance pendant le temps que dure le chauffage. Le degré de chaleur à observer n'a pas besoin non plus d'être réglé bien exactement; il importe seulement qu'il soit élevé, car la transformation de l'azote en ammoniaque ne se fait que très incomplètement si l'on ne chauffe qu'à 100—150°.

Comme toutes les substances organiques, quelle qu'en soit l'origine, se dissolvent lorsqu'on les chauffe avec de l'acide sulfurique concentré, on n'a pas besoin de pousser la pulvérisation de la matière à analyser plus loin qu'il n'est nécessaire pour obtenir un bon échantillon moyen. Cette circonstance me semble aussi être un avantage de la nouvelle méthode qui n'est pas à dédaigner. M. Ritthausen a insisté à plusieurs reprises sur l'importance de ne soumettre les substances albuminoïdes à l'analyse dans le tube à combustion qu'après les avoir réduites en poudre extrêmement fine. J'ai moi-même eu souvent l'occasion d'observer qu'une pareille pulvérisation était nécessaire pour doser l'azote dans diverses matières végétales, et me suis aussi assuré plusieurs fois qu'en la poussant encore plus loin, on pouvait obtenir une petite augmentation dans le rendement de l'ammoniaque. Cependant, comme en opérant ainsi, on pourrait facilement s'exposer à produire une désagrégation, j'ai, en général, pour les analyses par combustion, effectué la pulvérisation en écrasant la substance, préalablement pesée, dans un grand mortier en porcelaine avec de la poudre de verre peu fusible ou de quartz, jusqu'à ce que le tout fût réduit en poussière impalpable; mais ce travail assurément très pénible

et très fatigant, on en est dispensé dans la nouvelle méthode, l'acide sulfurique produisant une division bien autrement radicale que la pulvérisation même la plus parfaite. L'essai même des grains pris tels quels se fait fort bien par cette voie.

Dans cette première opération, le traitement par l'acide sulfurique, la plus grande partie de l'azote, dans la plupart des cas, se transforme déjà en ammoniaque. Plusieurs substances, telles, par ex., que l'acide urique, l'asparagine, les substances gluténoïdes facilement décomposables, etc. abandonnent ainsi sous cette forme à peu près tout leur azote. D'autres substances albuminoïdes et, en général, les combinaisons appartenant au groupe des corps gras, cèdent au moins à l'acide la majeure partie de leur azote, soit 90—95 %. En revanche, les combinaisons aromatiques retiennent plus fortement l'azote sous la forme organique. Tel est déjà le cas là où l'azote se trouve à l'état d'amide, par ex. dans les sels d'aniline, mais encore à un plus haut degré dans les combinaisons où l'on doit supposer qu'il n'entre pas comme amide. C'est ainsi que plusieurs alcaloïdes, chez lesquels il y a lieu de croire que l'azote est un élément de l'anneau même de la benzine, ne donnent qu'une quantité d'ammoniaque très incomplète. En chauffant, par ex., pendant le même temps, avec le même volume d'acide sulfurique, des poids égaux d'albumine, de morphine et de quinine, j'ai pu ensuite par la distillation retirer de l'albumine, à l'état d'ammoniaque, 92 % de son azote, tandis que la morphine n'en a livré que 40 % et la quinine, 25 %. La caféine, soumise au même traitement, en a au contraire donné une proportion assez forte.

Après un chauffage prolongé avec l'acide sulfurique — 2 heures, en général, suffisent — on procède à l'oxydation. Elle se fait, comme nous l'avons dit, avec de l'hypermanganate de potasse, qui, pour cet usage, ne peut être remplacé par aucun autre oxydant. Dans les essais que j'ai effectués avec plusieurs autres corps analogues, par ex. avec le bichromate de potasse, j'ai constamment trouvé que leur action était loin d'égaler celle de l'hypermanganate, et que la formation de l'ammoniaque restait avec eux toujours très incomplète. L'hypermanganate s'emploie en poudre sèche assez fine, et, à cause de la violence de la réaction, il ne faut l'ajouter que par toutes petites portions à la fois, qui peuvent cependant se succéder très rapidement, l'action étant pour ainsi dire instantanée. On l'introduit donc dans le flacon sous forme d'une pluie fine et continue, ce qui peut se faire de plusieurs manières; comme appareil simple et pratique, je puis, dans ce but, recommander un large tube en verre dont la partie inférieure, d'un plus petit diamètre, porte au point où elle se rétrécit une toile métallique d'une finesse convenable. Après y avoir versé l'hypermanganate, on arrive en effet facilement, en tenant l'appareil sur l'orifice du flacon et en frappant dessus légèrement, à le faire tomber dans l'acide dans les conditions voulues. L'oxydation se fait dans le liquide tout chaud, mais il faut seulement avoir soin de retirer la lampe pendant l'introduction du réactif; toute l'opération ne dure qu'une fraction de minute. La réaction, comme il a été dit, est très violente; elle est accompagnée d'un dégagement de vapeurs

verdâtres et de fortes décrépitations, et l'on voit souvent jaillir de petites flammes. Cette circonstance pouvait faire craindre qu'il n'en résultât quelque perte, mais je me suis assuré par plusieurs centaines d'expériences qu'il ne s'en produit jamais pendant l'oxydation, même si elle se fait très vite.

Nous avons dit que l'hypermanganate doit être employé en excès; on reconnaît facilement quand cette condition est remplie aux changements de coloration qui accompagnent la réaction. Le liquide, qui généralement a une couleur assez foncée, s'éclaircit rapidement par une première addition du réactif oxydant, puis se décolore, et par une nouvelle addition, devient d'un beau vert foncé, ou, lorsqu'on a employé de l'acide phosphorique anhydre, bleu verdâtre par suite de la formation d'un sel de sesquioxyde de manganèse. L'apparition de la couleur verte indique que l'oxydation est terminée; j'ai ensuite l'habitude de laisser le flacon pendant encore 5 — 10 minutes sur une faible flamme de gaz, sans que cependant il faille attacher à cela grande importance. Mais il faut bien se garder, après que la couleur verte a apparu, de chauffer de nouveau fortement le liquide. En effet, il se produit alors une réduction avec formation d'un sel de protoxyde de manganèse et grand dégagement d'oxygène, et le liquide redevient clair, changement que j'ai souvent eu l'occasion de voir accompagné d'une perte sensible d'ammoniaque.

Après l'avoir laissé refroidir, on étend d'eau le liquide, dont la couleur, au même moment, passe du vert au brun, et, après un nouveau refroidissement, on transvase le contenu du flacon dans un ballon distillatoire d'une contenance de $^3/_4$ de litre env. Le ballon est relié par un bouchon en caoutchouc à une allonge qui est destinée à empêcher les projections du liquide de passer dans le produit de la distillation, et qui elle-même communique avec un petit serpentin, à l'extrémité inférieure duquel est suspendu l'appareil d'absorption renfermant l'acide qui doit recevoir l'ammoniaque. J'ai d'abord employé l'appareil à 3 boules de M. Péligot, mais je l'ai remplacé plus tard par un petit flacon de $^1/_4$ de litre avec un bouchon en caoutchouc percé de deux trous, dont l'un livre passage au tube du serpentin, qui descend jusqu'au milieu de flacon, sans atteindre le niveau de l'acide, et l'autre, à un tube qui le fait communiquer avec l'air extérieur. De nombreux essais faits avec des sels ammoniacaux purs ont montré que l'absorption par ce procédé est aussi complète qu'avec l'appareil à boules; grâce même au serpentin, la condensation de l'ammoniaque est si complète que, sans qu'il en résulte aucune perte sensible, on peut attendre que la distillation soit terminée, pour verser l'acide dans le flacon qui sert de récipient. Cette disposition est commode parce qu'elle permet d'opérer le titrage dans le flacon lui-même, et qu'on est ainsi dispensé de tout transvasement et de tout lavage.

La dissolution de soude qu'on emploie doit être concentrée (d'une densité de 1,3 par ex.), pour éviter la perte de temps qu'entraînerait la distillation d'un grand volume de liquide. Il importe peu d'ailleurs qu'elle soit pure pourvu qu'au préalable on l'ait bien fait bouillir.

En prenant constamment la même quantité d'acide sulfurique et de soude au même degré de concentration, on pourra toujours en

employer le même volume, par ex., avec les proportions adoptées ici, 40 c. c. de soude, qu'on mesure dans une éprouvette et verse rapidement dans le ballon distillatoire en ayant soin de le refermer aussitôt. De nombreux essais faits avec de sels ammoniacaux purs m'ont prouvé qu'il n'y a aucune perte à craindre dans le court moment que dure cette opération, et par suite qu'il n'est pas besoin de prendre des dispositions spéciales pour ajouter l'alcali.

Comme le contenu du ballon distillatoire représente une dissolution très concentrée de sulfate de soude avec de la soude en excès et un précipité d'oxydes hydratés, l'ébullition donne bientôt lieu à des soubresauts extrêmement violents qui rendraient la distillation à peu près impossible. Les fils de platine ne sont pas ici d'une grande utilité, car la couche d'air qui y adhère est vite chassée, après quoi les soubresauts recommencent. Mais on peut facilement les prévenir, et cela d'une manière complète, en introduisant dans le ballon, avant d'y verser l'alcali, quelques petits morceaux de zinc. Il se dégage alors du zinc, dans le liquide alcalin, un faible courant d'hydrogène, grâce auquel la distillation se poursuit sans aucune difficulté et très paisiblement, même si l'on force l'ébullition. Ce n'est que vers la fin que les soubresauts se renouvellent, sans doute lorsque la dissolution a atteint un degré de concentration tel, que le sulfate de soude commence à se déposer; mais, à ce moment, toute l'ammoniaque a dèja passé à la distillation. Que la présence du zinc n'occasionne aucune perte d'ammoniaque, c'est ce que j'ai également constaté par des essais avec des sels ammoniacaux.

Relativement au dosage de l'ammoniaque, il peut naturellement s'effectuer par le procédé que l'on préfère. La méthode avec le bichlorure de platine et celle des dissolutions titrées m'ont donné des réultats concordants, ce qui prouve que c'est bien de l'ammoniaque, sans mélange d'amines, qui se forme ici. C'est encore un avantage de ma méthode, avantage qui se manifeste surtout lorsqu'on opère avec les dissolutions titrées, que nous avons affaire ici à une dissolution pure, claire et incolore d'ammoniaque, tandis que, par le procédé avec la chaux sodique, elle est souvent trouble et colorée par divers autres produits de la combustion qui peuvent gêner sensiblement le titrage.

Bien que les différents procédés de dosage de l'ammoniaque donnent des résultats concordants, je dois cependant exposer ici une méthode dont je me suis presque toujours servi. Cette méthode est déjà ancienne, mais semble être tombée à peu près dans l'oubli, et cela bien à tort, car elle est à la fois très commode et très exacte. Elle est fondée sur la réaction connue, que, par l'addition d'un acide dans un mélange d'iodate de potasse et d'iodure de potassium, il se sépare une quantité d'iode équivalente à celle de l'acide employé, et qui peut ensuite être déterminée à l'aide d'un dissolution titrée d'hyposulfite de soude. Comme cette détermination, avec l'eau d'amidon pour auxiliaire, ne saurait guère en précision être égalée par aucune autre, on pourra aussi, par suite, doser l'acide avec une exactitude peu ordinaire, de même qu'il deviendra possible, ce qui, dans le cas dont il s'agit, est en général fort à désirer, d'employer des dissolutions

normales très diluées et, par conséquent aussi, d'opérer sur une très petite quantité de matière sans que l'analyse en devienne moins exacte. Avec 10 c. c. d'acide sulfurique il est en effet déjà assez difficile d'en dissoudre sans perte 1 gr., et pourtant il peut souvent être désirable, pour l'analyse de matières très pauvres en azote, comme par ex. les céréales, d'en prendre 1 gr. et davantage pour avoir un nombre convenable de centimètres cubes d'acide neutralisés par l'ammoniaque qui s'est formée. Mais, comme il serait incommode d'augmenter la quantité d'acide, mieux vaut diminuer celle de la substance à analyser. Or, vu l'extrême sensibilité de la réaction de l'iode, on ne saurait être en doute sur une goutte de plus ou de moins, même avec une dissolution d'hyposulfite de soude $^1/_{20}$ normale. Aussi, en employant une pareille dissolution,, pourra-t-on toujours se contenter pour une analyse d'une quantité relativement petite de matière, en général bien au-dessous de 1 gr. J'ai d'ordinaire constamment pris 30 c. c. d'acide sulfurique, dont le titre, d'ailleurs indifférent, pourvu qu'il fût exactement connu par rapport à celui de l'hyposulfite, était également ramené à $^1/_{20}$ normal environ. La quantité de matière à employer pour une analyse se règle alors d'après la teneur $^0/_0$ en azote, qui en général est connue à l'avance entre certaines limites, de manière que le produit de ce chiffre par le poids de la substance en grammes tombe entre 1 et 2. Dans ces conditions, l'ammoniaque formée neutralisera de 14 à 28 c. c. d'acide, et comme celui-ci se laisse facilement titrer avec une approximation de $^1/_{10}$ — $^1/_{20}$ de c. c., on voit que l'exactitude de ce procédé ne laisse guère rien à désirer.

D'après ce principe, pour l'analyse de céréales renfermant en moyenne 1,5 $^0/_0$ d'azote, il suffira d'en prendre 0,7 gr. environ, et pour celle de substances alimentaires plus azotées, avec 5 $^0/_0$ d'azote env., 0,25 gr. Mais, s'il s'agit de matières très riches en azote comme les substances albuminoïdes pures ou autres analogues, on arriverait de cette manière à opérer sur des quantités par trop petites; on peut alors ou mettre plus d'acide dans le récipient, ou employer des dissolutions normales plus concentrées, ou bien encore, comme il est plus commode de travailler toujours avec les mêmes, peser, par ex., de la matière à analyser une quantité quatre fois plus grande et, après avoir porté à 100 c. c. le volume de la dissolution oxydée, en prendre 25 c. c. pour la distillation.

Relativement à la marche à suivre pour le titrage, après avoir introduit dans le liquide quelques cristaux d'iodure de potassium, on y verse la dissolution d'amidon pas en trop petite quantité (je rapelle que de sa bonne préparation dépend en grande partie de la succès de l'opération), et ajoute ensuite quelques gouttes d'une dissolution d'iodate de potasse à 4 $^0/_0$ env. Lorsque la couleur bleue, par l'addition de la dernière goutte d'hyposulfite de soude, a disparu, elle reparaît peu de temps après sous l'action de l'acide carbonique de l'air. Cette circonstance n'offre du reste aucun inconvénient, pourvu seulement qu'on n'opère pas trop lentement. En tout cas, l'acide carbonique est bien moins gênant ici que dans le titrage ordinaire d'un acide avec de l'alcali normal.

Un grand avantage de ce procédé, c'est qu'il donne d'aussi bons résultats à la clarté d'une lampe qu'à celle du jour. Il présente ce

seul inconvénient que la dissolution très étendue de l'hyposulfite de soude est peu stable, ce qui oblige, avant chaque série d'analyses, d'en contrôler le titre à l'aide de la dissolution normale d'iode ou de l'acide. D'ailleurs, lorsqu'on connaît le titre de son hyposulfite à l'état solide, il est très facile d'en préparer une dissolution fraîche.

Le calcul des résultats est très simple, car on n'a qu'à multiplier par 7 (demi-équivalent de l'azote) le nombre de centimètres cubes qu'on a employés de la dissolution $^1/_{20}$ normale de l'hyposulfite de soude, et le produit divisé par la quantité de substance analysée, exprimée en centigrammes, donne la teneur $^0/_0$ en azote. On arrive au même résultat en se servant d'une dissolution $^1/_{14}$ normale d'hyposulfite et en divisant le nombre des centimètres cubes employés par la quantité ci-dessus.

Pour plus de clarté, nous donnerons ici quelques exemples.

On a une dissolution $^1/_{20}$ normale d'hyposulfite. L'acide sulfurique du récipient est également $^1/_{20}$ normal. 30 c. c. acide sulfurique = 30 c. c. hyposulfite.

Comme contrôle, on prend 0,5 gr. de sucre pur + 10 c. c. d'acide sulfurique concentré. Après distillation, avec 30 c. c. d'acide sulfurique $^1/_{20}$ normal dans le récipient, ceux-ci ne prennent que 29,8 c. c. de la dissolution d'hyposulfite, nombre qui, par conséquent, doit être employé au lieu de 30 dans les analyses qui suivent:

0,645 gr. d'orge ont été traités de la même manière. L'acide non neutralisé a pris 14,5 c. c. d'hyposulfite. 29,8 — 14,5 = 15,3; $\frac{15{,}3 \cdot 7}{64{,}5} = 1{,}66\ ^0/_0$ Az.

0,440 gr. de caséine ont été soumis au même traitement, avec cette différence qu'on a porté à 100 c. c. le volume du mélange oxydé et en a distillé 25. L'acide non neutralisé a pris 5,8 c. c. d'hyposulfite. 29,8 — 5,8 = 24,0; $\frac{24{,}0 \cdot 7}{44{,}0} \times 4 = 15{,}3\ ^0/_0$ Az.

Preuves de l'exactitude de la méthode. J'ai cherché à me les procurer, en partie par l'analyse de substances pures dont la teneur en azote était connue, en partie par des déterminations dans un grand nombre de matières diverses d'origine animale ou végétale, déterminations que j'ai ensuite contrôlées par des analyses d'après la méthode de Will et Varrentrapp. Des nombreux résultats ainsi recueillis, je communiquerai ici les suivants, qui suffiront pour faire juger du reste.

	Trouvé par la nouvelle méthode.	Calculé.
Triæthylamine	10,16 $^0/_0$ Az.	10,18 $^0/_0$ Az.
Asparagine	18,7	18,67
Acide urique	33,1	33,3
Urée	46,6	46,7
Chlorhydrate d'aniline	10,65	10,82
Indigotine	10,60	10,68
Acide hippurique	7,75	7,82

	Trouvé par la nouveell méthode.	Calculé.
Chlorhydrate de morphine . .	4,21 °/o Az.	4,36 °/o Az.
Chlorhydrate de quinine	7,47	7,77
Caféine	28,6	28,86
		Trouvé par la méthode de Will et Varrentrapp.
Caséine	15,6	15,6 °/o Az.
Albumine de l'œuf	15,3	15,6
Conglutine des amandes	17,5	17,6
Amygdaline	3,01	3,03
Haricots blancs	3,20	3,21
Froment Squarehead	1,94	1,96
Seigle	1,46	1,47
Orge	1,33	1,33
id.	1,72	1,71
id.	1,53	1,55
Extrait de malt	0,81	0,83
Extrait de bière	1,10	1,12
Levûre sèche	10,4	10,6
Viande de bæuf	12,49	12,43
Peptone de Witte	13,2	13,2

Comme on le voit, l'accord est partout très satisfaisant. Il n'y à guère, que quelques alcaloïdes dont on n'obtient pas sous ce rapport la décomposition complète; tel est en particulier le cas pour la quinine, qui, ainsi qu'il a été dit plus haut, retient très fortement son azote. A cette occasion, je ferai remarquer que j'ai toujours obtenu de bons résultats en analysant les alcaloïdes par la méthode de la chaux sodique, et que les résultats très divergents auxquels on est arrivé doivent certainement en partie être attribués à la formation incomplète de l'ammoniaque, circonstance qui, dans ce cas, se produit avec une si grande facilité lorsque, conformément à la règle généralement suivie, on ménage par de petits chocs un canal tout le long du tube suivant son arête supérieure. Du moins, en procédant de cette manière à l'analyse du chlorhydrate de quinine, par ex., j'ai à peine atteint la moitié du rendement théorique, tandis qu'une analyse, exécutée dans des circonstances tout à fait identiques, seulement sans canal, m'a donné un résultat parfaitement exact. On a évidemment beaucoup plus à craindre ici une perte causée par la formation de gaz azotés qui ne sont pas absorbés par l'acide, que celle qui peut résulter de la dissociation de l'ammoniaque, et sur laquelle on a si souvent appelé l'attention. Aussi, pour plus de sûreté, ai-je pris l'habitude de mélanger avec un peu de sucre la chaux sodique pure dont on remplit la partie antérieure du tube. Celle-ci, autrement, se contracte sous l'action de la chaleur en laissant un vide entre elle et la paroi du tube, tandis qu'après la combustion du sucre, elle forme une masse poreuse qui remplit entièrement le tube, et à travers laquelle sont obligés de passer tous les gaz qui se dégagent dans le cours de l'opération. Si cette question a été soulevée principalement à l'occasion des alcaloïdes, c'est sans nul doute à cause de la grande

énergie avec laquelle ils retiennent leur azote, énergie qui se manifeste dans le procédé par combustion aussi bien que dans la décomposition par l'acide sulfurique. Voilà aussi pourquoi, en ce qui concerne les substances albuminoïdes et autres analogues qui abandonnent plus facilement leur azote, on peut obtenir des résultats exacts même en ménageant un canal dans le tube.

Si j'ai avancé que la nouvelle méthode était applicable à toutes les substances organiques, toutefois avec certaines réserves relativement à quelques alcaloïdes, il va cependant sans dire qu'il faut en excepter celles qui renferment l'azote à l'état d'acides volatils, par conséquent les combinaisons du cyanogène et les oxydes de l'azote. Pour ce qui regarde ces derniers et notamment les azotates, il y a pourtant une observation singulière à faire. Tandis qu'on devrait s'attendre que l'acide azotique fût chassé par un chauffage de plusieurs heures avec de l'acide sulfurique concentré en grand excès, j'ai constaté qu'en présence d'un substance organique, la plus grande partie de l'acide se transformait en ammoniaque. C'est ainsi que l'azotate de strychnine, qui renferme en tout 10,6 % d'azote, dont 7,05 % appartenant à l'alcaloïde, m'a donné par la nouvelle méthode 10,1 % d'azote au lieu d'un peu moins de 7 %, comme il était à prévoir. De même, en traitant par l'acide sulfurique concentré du salpêtre mélangé avec 3—4 fois son poids de sucre pur, j'ai obtenu de 60 à 80 % de son azote à l'état d'ammoniaque. En général, il n'est pas facile de chasser l'acide azotique d'un mélange renfermant des substances organiques, sans qu'il se forme de l'ammoniaque. Il s'en produit même en chauffant avec de l'acide sulfurique étendu lorsque, vers la fin, la dissolution a acquis un plus grand degré de concentration. J'ai essayé d'appliquer le principe connu pour la détermination de l'acide azotique en ajoutant, pendant l'ébullition, à la substance dissoute ou délayée dans l'eau un mélange de protochlorure de fer et d'acide chlorhydrique; mais, même en opérant ainsi, on est exposé à voir se former un peu d'ammoniaque si la proportion de la substance organique est très grande par rapport à celle de l'acide azotique.

De tous les avantages qu'offre la nouvelle méthode, l'énorme économie de temps qu'elle procure est sans contredit celui qui saute le plus aux yeux. J'ai ainsi, dans un jour et sans aucune assistance, effectué 14 dosages d'azote, et il ne serait guère difficile, avec un plus grand nombre de becs de gaz et plusieurs appareils distillatoires (3), d'en faire jusqu'à 20. Que cette méthode donne également des résultats exacts, c'est ce qui ressort des analyses p. 10—11, de même que mes analyses comparatives ont pour ainsi dire toujours présenté une très grande concordance. D'un autre côté, les manipulations qu'elle exige sont tellement faciles qu'une personne, même complètement étrangère aux opérations chimiques peut, après quelques jours d'exercice, être mise en état de faire elle-même ces analyses. Enfin, elle ne demande qu'un appareil très simple, quelques petits flacons et un appareil distillatoire ordinaire, et est d'une exécution bien moins coûteuse que la méthode habituelle, puisqu'on économise le tube à combustion en même temps qu'un grand volume de gaz, chaque analyse n'en prenant que 4 pieds cubes (124 déc. c.) environ.

Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques.

Par

Emil Chr. Hansen.

II.

Les ascospores chez le genre Saccharomyces.

(Avec 3 Planches.)

Qu'avons-nous su jusqu'ici à ce sujet?

Dans le texte danois, p. 29—43, j'ai passé en revue, en les soumettant à un examen critique, les travaux qui ont été publiés sur cette question pendant les 15 dernières années. A côté d'un petit nombre d'observations bien faites, on y trouve des erreurs graves et des vices de méthode, des vues contradictoires et des assertions hasardées. Une étude attentive de cette série de travaux n'en est pas moins, sous plusieurs rapports, intéressante et instructive, mais je dois me borner, dans ce résumé, à mentionner les points principaux.

La première communication relative à l'existence de spores chez le genre Saccharomyces est due à M. J. de Seynes[1]). Il les observa en effet, en 1868, chez une espéce rapportée par lui au Mycoderma vini Desm.

A peu près à la même époque, M. Reess[2]) avait commencé à étudier les espèces du genre Saccharomyces. Pour reconnaître si les cellules de la levûre basse pouvaient développer une moisissure, il en sema sur des tranches de pommes de terre, de carottes, etc., qui

---

[1]) J. de Seynes, Sur le Mycoderma vini. (Comptes rendus, Tome LXVII, 1868, p. 105—109. Ann des sc. nat. Botanique, 5 série, X, 1869, p. 5—9.)

[2]) Reess, Zur Naturgeschichte der Bierhefe, Sacch. cerevisiæ Meyen. (Botan. Zeitung, XXVII Jahrg., 1869, p. 105—118.)
—, Botan. Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze, 1870.

furent ensuite exposées sous une cloche maintenue humide. Contre son attente, il se produisit des spores dans l'intérieur de quelques cellules. A cause de la conformité que ces spores, sous certains rapports, ont avec celles des ascomycètes inférieurs, M. Reess les appelle ascospores et donne à la cellule mère le nom d'ascus. Lors de la germination des spores, il ne se développait que des cellules de levûre bourgeonnantes ordinaires.

Comme M. Reess a toujours travaillé avec des matériaux impurs, il est à prévoir qu'il n'a pu, sur plusieurs points, éviter de se tromper. Tel est, par ex., le cas pour les résultats qu'il croit avoir obtenus par la culture de la levûre basse, car tout prouve qu'il n'a pas observé d'ascospores chez cette forme de levûre, mais bien chez une ou plusieurs espèces de levûres spontanées. Ce qu'il communique au sujet d'un développement d'ascospores chez la levûre haute est tout à fait erroné, et il en est de même de sa remarque, que la production des ascospores serait favorisée par une basse température. A l'exception du Sacch. apiculatus, il décrit des ascospores chez toutes les espèces établies par lui, dans quelques cas, se sert de leurs dimensions comme caractère; mais une étude plus attentive montre qu'il n'existe pas dans la nature des limites telles que celles qu'indique M. Reess, observation qui s'applique en général aux caractères systématiques par lesquels il croit pouvoir différencier les espèces.

M. Engel[1]), dans son mémoire publié en 1872, communique une meilleure méthode pour produire le développement des spores. Les cellules de levûre sont semées sur la surface unie d'un bloc de plâtre, qu'on place ensuite dans un verre renfermant de l'eau afin que cette surface soit maintenue humide, après quoi on recouvre le vase avec une plaque de verre ou autrement. Le mémoire en question n'est du reste, en majeure partie, qu'une répétition dénuée de critique des résultats que M. Reess croyait avoir obtenus.

M. Engel dit avoir découvert chez le Sacch. apiculatus une nouvelle forme de fructification qui lui donnerait une certaine ressemblance avec le Protomyces macrosporus. Bien qu'il reconnaisse lui-même que ses recherches sur ce point n'ont pas été poursuivies jusqu'au bout, il n'hésite pas cependant, à cause de cette prétendue nouvelle forme de fructification, à faire de cette espèce le représentant d'un nouveau genre Carpozyma. J'ai déjà fait observer, dans un mémoire précédent[2]), que la communication de M. Engel repose sur une erreur, et puis maintenant ajouter qu'après avoir repris et varié de différentes manières ses expériences, je suis arrivé à ce résultat positif que le Sacch. apiculatus ne produit pas les organes de fructification décrits par M. Engel. Travaille-t-on sans beaucoup de soin, comme l'a fait M. Engel, on peut bien, de temps à autre, trouver

---

1) Engel, Les ferments alcooliques, 1872.
2) Emil Chr. Hansen. Ueber Saccharomyces apiculatus. (Hedwigia 1880, p. 75) et surtout: Sur le Sacch. apiculatus et sa circulation dans la nature. (Résumé du compte rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg, I. vol. Copenhague 1881 p. 173.)

dans les cultures sur le plâtre des corps qui ressemblent à la fructification de Protomyces qu'il a représentée, et leur apparition est aussi fréquente dans les cultures des autres espèces que dans celles du Sacch. apiculatus. Maintient-on au contraire les cultures parfaitement pures; ils cessent de s'y montrer. J'ai vainement essayé jusqu'ici de les classer; mais, d'après ce qui précède, il est certain qu'ils ne représentent pas une phase de développement du Sacch. apiculatus. Le nouveau genre établi par M. Engel ne saurait donc être reconnu.

M. Brefeld[1]) a attaqué l'interprétation donnée par M. Reess de la signification morphologique des spores des Saccharomyces. Ce genre est, suivant lui, voisin du Mucor racemosus. La cellule de levûre, avec ses spores endogènes, devient alors un petit sporange. Sous le nom d'asci, il ne comprend que des cellules qui non seulement produisent des spores dans leur intérieur, mais qui en outre se sont développées de la seconde génération asexuée issue d'un ascogon fécondé, et par suite la cellule de levûre ne peut être considérée comme un ascus. Ces objections, qui avaient quelque fondement à l'époque où il les a publiées, ont maintenant perdu de leur valeur, et quant à sa nouvelle interprétation, on peut en dire la même chose que de plusieurs des systèmes dont la morphologie compte un si grand nombre, qu'elle n'est ni meilleure ni plus mauvaise que l'ancienne. Il y a des raisons qui parlent en faveur de l'une et de l'autre, mais il n'y en a aucune qui soit décisive, et la question reste encore toujours pendante. Aussi nous en tiendrons-nous provisoirement, au point de vue de la morphologie, à l'interprétation de M. Reess, comme ayant la priorité de date.

Le travail de M. Reess a encore soulevé d'autres objections. C'est ainsi que M. Eidam[2]) assure que tant lui que plusieurs autres expérimentateurs ont toujours obtenu un résultat négatif en essayant de faire développer des ascospores des cellules de levûre, ce qui semblait impliquer que MM. Reess et de Seynes s'étaient peut-être trompés, et que les cellules de levûre ne pouvaient pas produire ces organes de fructification.

M. Brefeld[3]) s'est en partie exprimé de la même manière dans ses communications biologiques sur les ferments alcooliques. Suivant lui, les cellules de la levûre employée dans l'industrie (levûre haute et levûre basse des brasseries, et levûre des boulangers) ne peuvent développer des spores, et comme les cellules de la levûre du vin (levûre naturelle, levûre spontanée) jouissent à un très haut degré de cette propriété, il en conclut que la levûre de l'industrie l'a perdue à la suite d'une culture prolongée qui ne favorise que le bourgeonnement. Mais les recherches sur lesquelles M. Brefeld appuie cette

---

[1]) Brefeld, Mucor racemosus und Hefe. (Flora, 56 Jahrg. 1873, p. 385-399.)
[2]) Eidam, Der gegenwärtige Standpunkt der Mycologie, 1871, p. 30, zweite Auflage, p. 59—60.
[3]) Brefeld, Beobachtungen über die Biologie der Hefe. (Sitzungsber. der Gesellschaft naturforschender Freunde zu Berlin. 16 März 1875. Botan. Zeitung 1875 p. 401.

conclusion sont manquées, et la conclusion elle-même est par conséquent inexacte.

Les recherches que je poursuis depuis plusieurs années sur les ferments alcooliques m'ont donné la certitude que non seulement la „levûre spontanée“, mais aussi la levûre de l'industrie développe des ascospores. J'en ai, même avec facilité, obtenu un développement abondant non seulement avec la levûre haute (Sacch. cerevisiæ) des distilleries et des fabriques de levûre de boulanger de Copenhague, de la distillerie de Biesdorf, de celle de Helbing, à Wandsbek, et de la fabrique de levûre de Mautner, à Vienne, mais aussi avec la forte levûre haute type qui est cultivée depuis un temps immémorial dans les brasseries d'Edimbourg, et nous fournit ainsi un remarquable exemple d'une levûre de ce genre vraiment ancienne. La fermentation haute, dans les îles Britanniques, appartient en effet à la plus ancienne industrie de fermentation que nous connaissions, et, tandis que, dans les brasseries du continent, elle a été peu à peu remplacée par la fermentation basse, elle y a été jusque dans ces derniers temps exclusivement employée. J'ai également constaté que la levûre basse des brasseries peut développer des ascospores, quoique moins facilement que les levûres mentionnées plus haut. C'est donc un fait acquis que la levûre de l'industrie, aussi bien que la levûre spontanée, peut donner naissance à des ascospores. D'un autre côté, voilà près de trois ans que je cultive dans du moût des levûres du groupe Sacch. Pastorianus dans le laboratoire de Carlsberg, et, pendant ce temps, j'en ai produit des générations sans fin, sans qu'il m'ait jamais été possible de découvrir la moindre trace d'affaiblissement dans leur faculté de former ces organes de fructification, et cependant mon attention était spécialement fixée sur ce point.

Dans ses cultures d'ascospores M. Brefeld s'est servi d'une lame de verre porte-objet, procédé qui avant lui avait été employé par M. David[1]).

M. Müntz[2]) dit avoir observé que les cellules de levûre de bière qui étaient cultivées dans une dissolution de glucose, produisaient des ascospores quand on y faisait passer un courant d'oxygène. Dans le texte danois, p. 36, sont décrites quelques expériences que j'ai faites à cette occasion, et qui montrent qu'un traitement par l'oxygène poursuivi pendant 5 heures n'exerce sous ce rapport aucune influence.

Tandis que les auteurs précédents, malgré les divergences que leurs communications présentent sur plusieurs points, sont cependant tous d'accord pour regarder les ascospores comme des organes de fructification normaux, M. van Tieghem[3]) a proposé une interpréta-

---

[1]) David, Ueber Rothweingährungspilze. (Annalen der Oenologie, 4 B. 1874, p. 223).

[2]) Müntz, Recherches sur les fonctions des champignons. (Comptes rendus hebd. des séances de l'Acad. des Sciences 1875, T. 80, p. 178—181. D'après le „Botan. Jahresbericht.“ 3. Jahrgang. p. 171.

[3]) Ph. van Tieghem. Troisième Mémoire sur Les Mucorinées. (Extrait des ann. des sc. nat. Botanique, 6 série, IV, 1878, p. 9.)

tion toute nouvelle. Suivant lui, la formation des ascospores est due à un état maladif du protoplasme qui aurait pour cause une altération des cellules de levûre par des bactéries. J'ai soumis la question à une épreuve expérimentale sur laquelle je reviendrai plus loin; elle m'a clairement montré que l'opinion de M. van Tieghem est erronée.

Pour ce qui concerne les autres travaux relatifs aux ascospores des Saccharomyces, je me réfère en partie au texte danois, en partie à la liste qu'on trouvera ci-dessous de la littérature du sujet.[1])

Si nous demandons quels résultats certains ont donnés les travaux que nous venons de passer en revue, nous voyons qu'à proprement parler, ils se bornent aux renseignements qui sont surtout dus à M. Reess, à savoir que des espèces du genre Saccharomyces, sous certaines conditions encore imparfaitement connues, peuvent former des cellules endogènes, et que celles-ci, par une culture dans des liquides nourriciers bien appropriés, se développent en cellules végétatives bourgeonnantes.

C'est d'ailleurs un point qui est toujours fort débattu, sans qu'on aboutisse à une solution définitive dans un sens ou dans l'autre, car les méthodes exactes, qui seules auraient pu y conduire, manquaient.

Les recherches sur les ascospores sont en connexion étroite avec la question fondamentale de la délimitation des espèces du genre Sac-

---

[1]) Cienkowski, Die Pilze der Kahmhaut. (Bullet. de l'Acad. impér. des sc. de St. Pétersbourg, T. XVII. 1873.)

Blankenhorn und Moritz, Unters. über den Einfluss der Temperatur auf die Gährung. (Annalen der Oenologie, 3 B. 1873, p. 11.)

Schumacher, Beiträge zur Morphologie und Biologie der Hefe. (Aus dem LXX. Bande der Sitzb. der k. Akad. der Wissensch. in Wien. I. Abth. Juni-Heft. Jahrg. 1874.)

Brefeld. Ueber Gährung. II—III. (Landwirthschaftl. Jahrb. IV B. 1875, p. 405—433 und V B. 1876, p. 281—343.)

Pasteur, Études sur la bière, 1876, p. 148 et 170.

Grawitz, Beiträge zur systemat. Botanik der pflanzlichen Parasiten mit experimentellen Untersuchungen über die durch sie bedingten Krankheiten. (Virchow's-Archiv. 70 B. 1877, p. 546—598.)

Reess. Ueber den Soorpilz. (Sitzungsbericht der physikalisch-medicinischen Societät zu Erlangen. Sitzung vom 9 Juli 1877. Botan. Zeitung 1878, p. 201.)

Bedeutung der technischen Rohstofflehre (techn. Waarenkunde) als selbstständiger Disciplin und über deren Behandlung als Lehrgegenstand an techn. Hochschulen. von Dr. Jul. Wiesner, Prof. an der Wiener Universität. (Dingler's Polytechnisches Journal. 237 B. Jahrg. 1880, p. 407 und folg.)

Kern. Ueber eine Milchferment des Kaukasus. (Botan. Zeit. XL. 1882, p. 264 und Biolog. Centralblatt 1882, 1 Mai.)

charomyces, question qui est de la plus grande importance tant pour la technique de la fermentation que pour la physiologie. Pour les praticiens, elle a deux faces; peut-on soumettre à une culture méthodique ces différentes espèces dont on affirme la présence, et les obliger à nous donner des produits doués de propriétés autres et meilleures que celles que possèdent nos espèces actuelles? Ou bien: les levûres spontanées sont-elles une cause de trouble dans le mode d'exploitation suivi maintenant? Et comment alors nous défendre contre elles? Mais, dans tous les cas, c'est la même importante question: comment nous y prendre pour les atteindre et les soumettre à une expérimentation, et à quoi pouvons-nous les reconnaître!

Les savants qui, depuis la publication du travail de M. Reess, se sont livrés à des recherches physiologiques expérimentales sur les ferments alcooliques, ont bien vu, en général, qu'à eux aussi il se présentait de ces questions embarrassantes, mais ils les ont mises de côté comptant bien se tirer d'affaire sans y avoir égard. Chaque levûre de l'industrie a tout uniment été rangée sous la dénomination de Sacch. cerevisiæ. C'est tout au plus si l'on a fait une distinction entre la levûre haute et la levûre basse, mais sans s'inquiéter de savoir si l'une d'elles était pure de tout mélange avec l'autre, ou si la levûre cultivée renfermait des levûres spontanées, de sorte qu'en réalité on travaillait un peu au hasard et ne pouvait établir aucun contrôle. Expérimenter constamment sur des grandeurs inconnues, qui, finalement, sont cependant présentées comme connues, telle est donc la méthode assez peu scientifique qui a en général été suivie. On se consolait avec l'espoir que ces espèces importunes, qui peut-être étaient présentes, devaient se comporter de la même manière au point de vue physiologique, mais c'était compter sans son hôte. Dans mes derniers travaux, j'ai, par ex., établi qu'il y a quelques levûres et quelques cellules ressemblant à des levûres qui, en opposition avec toutes les autres, agissent seulement comme ferments alcooliques sans avoir la faculté de séparer l'invertine[1]). Et, dans mes prochains mémoires, je ferai voir par des exemples que, dans le groupe de Saccharomyces qui est doué des deux sortes d'activité fermentative, on trouve aussi des différences physiologiques très marquées.

Si l'on introduit dans un même liquide nourricier deux levûres alcooliques dont l'une énergique et l'autre faible, celle-ci, en général, aura bien le dessous dans la lutte qui s'établit entre elles, mais, de son côté, elle ralentira aussi dans une certaine mesure la multiplication de sa puissante rivale[2]). Si maintenant, comme c'est généralement le

---

[1]) Emil Chr. Hansen, Sur le Saccharomyces apiculatus et sa circulation dans la nature (Hedwigia 1880, p. 75 et Résumé du compte-rendu des travaux du Laboratoire de Carlsberg. 1er Vol. 1881 p. 174) et: Recherches sur les organismes qui, à différentes époques de l'année, se trouvent dans l'air, à Carlsberg et aux alentours, et qui peuvent se développer dans le moût de bière (Le même Compte-rendu 1er Vol. 1882 p. 215).

[2]) Voir mon mémoire: Sur le Sacch. apiculatus etc. p. 179.

cas, les deux levûres ont le même aspect, il s'ensuivra, dans l'état actuel des choses, que l'expérimentateur commettra une erreur en attribuant à l'une d'elles les résultats qui sont dus à la concurrence de deux espèces rivales. De pareilles erreurs se sont fréquemment produites et si, vérification faite, il se trouve qu'elles ne sont pas très grandes, c'est l'effet d'un heureux hasard et la méthode employée n'y est pour rien.

On a beaucoup parlé et écrit sur la dégénération de la levûre des brasseries; les revues étrangères y consacrent habituellement des articles signés par les spécialistes les plus éminents. Cette dégénération est attribuée à l'influence du malt, de l'eau et d'autres facteurs. Mais en examinant de plus près les considérations présentées en faveur de cette hypothèse, on voit que le tout se réduit à un exposé vague et obscur qui n'est appuyé par aucune recherche expérimentale exacte. En quoi consiste cette dégénération? D'où savons-nous que le Sacch. cerevisiæ peut dégénérer? La réponse est facile à donner: pour le moment, nous ne savons pas encore ce que c'est que le Sacch. cerevisiæ!

C'est seulement quand on saura s'il existe ou non des espèces et des races distinctes et que les caractères en auront été déterminés, qu'il sera possible d'assurer des points de départ certains aux recherches physiologiques, qui ont une égale importance pour la théorie et la pratique. C'est seulement alors qu'avec la perspective d'obtenir une solution satisfaisante des questions qui se posent sans cesse devant nous, on pourra entreprendre l'étude de l'activité des différentes espèces, des lois régissant les cas très compliqués qui se présentent lorsque ces espèces entrent en concurrence les unes avec les autres ou avec des organismes tout différents, tels que les bactéries, des rapports entre la levûre haute et la levûre basse, des conditions à remplir pour l'apparition des variétés, de l'activité physiologique de ces dernières et de leurs rapports avec les formes primitives.

Pendant qu'en 1878, je travaillais à mon mémoire sur les organismes qui peuvent se développer dans la bière et le moût de bière, j'avais la conscience des questions que je viens d'indiquer, et comprenais qu'il n'était pas possible d'aller plus loin dans la voie suivie par mes devanciers; c'est pourquoi, dans ma notice sur le genre Saccharomyces, je me suis surtout référé aux travaux déjà existants et, en rappelant combien nos connaissances à cet égard étaient incertaines, ai fait observer que les recherches, pour pouvoir réellement produire au delà de ce que MM. Reess et Pasteur avaient donné, devaient être entreprises à des points de vue tout autres qu'auparavant. Je soumis d'abord le Sacch. apiculatus, espèce qui se prête avec le plus de facilité à l'expérimentation, à une recherche portant sur différents points, et ce travail fut relativement aisé; mais les autres espèces me réservaient de très grandes difficultés. Bien que je n'aie cessé, pendant des années, de poursuivre la solution du problème, ce n'est qu'en 1881 que je réussis à la trouver et, après en avoir vérifié l'exactitude, j'en fis, l'année suivante, l'objet d'une courte communication

dans le „Compte-rendu des travaux du Laboratoire de Carlsberg“ Vol. 1, p. 205.

Les recherches dont il s'agit entrent ainsi dans de nouvelles voies, qui, je l'espère, conduiront à une réforme.

Je me propose, dans une série de mémoires, de traiter successivement à part chacun des éléments de la longue suite de recherches qu'exige cette étude. Dans ce qui suit, je m'occuperai principalement de l'influence de la température sur la formation des ascospores.

Méthodes.

Quiconque veut entreprendre des recherches expérimentales sur les ferments alcooliques, sera naturellement amené à faire une étude approfondie des „Études sur la bière“ de M. Pasteur; ce livre est en effet l'ouvrage principal sur cette matière.

Dans le quatrième chapitre, l'auteur traite de l'importante question des cultures à l'état de pureté et, parmi les formes sur lesquelles il expérimente, se trouve aussi un des organismes que M. Reess rapporte au genre Saccharomyces, à savoir le Sacch. Mycoderma (Mycoderma vini) p. 109. Du vin, où il avait formé une membrane, il était semé dans du moût de bière, de là dans de l'eau de levûre sucrée et de nouveau enfin dans du moût de bière, M. Pasteur opérait comme d'habitude avec ses ballons connus à deux tubulures, avec un tube droit et court et un autre long et recourbé (voir sa Fig. 22), et les ensemencements se faisaient à l'aide d'un fil de platine passé préalablement dans une flamme, qu'il trempait dans la membrane et portait ensuite dans un des ballons, en ayant soin de ne le tenir ouvert qu'un instant. „De cette manière,“ dit M. Pasteur, „on éloigne du mycoderme toute trace de spores étrangères, particulièrement les germes du mycoderma aceti, compagnon habituel du mycoderma vini. Le mycoderma aceti se propage très difficilement sur les liquides sucrés neutres. Les jours suivants, des voiles de mycoderma vini s'étendent à la surface des liquides dans les ballons. Leur apparence est très pure. On vérifie au microscope l'absence complète d'un mélange de mycoderma aceti, de levûre lactique, etc.“ Telles sont les cultures pures de M. Pasteur.

Il y a ici deux points à considérer, à savoir comment il obtient ses cultures à l'état de pureté, et ensuite comment il les maintient à l'abri de toute infection du dehors pendant la durée des expériences. Relativement au premier point, nous avons vu qu'il cherche à atteindre son but en favorisant constamment, dans une série de cultures, l'organisme qu'il veut conserver, et en arrêtant en même temps le développement de celui ou de ceux qu'il veut éliminer. Dans l'expérience ci-dessus décrite, l'examen microscopique a montré qu'il n'y avait ni bactéries ni moisissures et que le voile ou la membrane ne se composait que de cellules ressemblant à des Saccharomyces. M. Pasteur

s'en tient là et regarde comme acquis que ces cellules appartiennent toutes à une seule espèce. Mais il n'a aucune certitude à cet égard. Il y a en effet plusieurs espèces de cellules qui, dans les conditions alimentaires mentionnées plus haut, peuvent former des membranes, et qui, à l'examen microscopique, ne peuvent être distinguées les unes des autres; la membrane peut même renfermer des cellules de levûres dont la nature est d'ailleurs de vivre à l'état de levûre de dépôt, et comme elles ont souvent la même forme et, en général, le même aspect que les espèces qui produisent des membranes, il n'est par suite pas possible de les découvrir par un simple examen microscopique. Par son procédé de culture, M. Pasteur a seulement pu écarter les organismes qui, dans les conditions alimentaires par lui choisies, n'étaient pas en état de soutenir une concurrence contre l'organisme favorisé, mais il y en a une foule d'autres (tous ceux qui demandent à peu près la même alimentation que cet organisme) qui peuvent vivre ensemble avec ce dernier sans qu'ils se gênent beaucoup mutuellement. Il est, en un mot, impossible d'établir une culture qui ne favorise qu'une seule des nombreuses espèces existantes. Ce procédé ne pourra donc être employé avec quelque certitude que dans les cas très rares où l'on aura affaire avec des espèces douées de caractères si distincts qu'il ne sera pas facile de les confondre avec d'autres, et qu'un contrôle deviendra par suite possible.

Mais supposons que M. Pasteur ait réellement réussi à obtenir une culture à l'état de pureté; nous arrivons alors au second côté de la question; comment la conserve-t-il? Ses ballons sont à cet égard d'un précieux secours. Relativement à leur emploi, nous ne pouvons mieux faire que de renvoyer aux descriptions détaillées qui se trouvent dans son ouvrage cité plus haut, p. 29 et suivantes. Ils sont surtout très utiles dans les cas où l'on doit cultiver pendant longtemps un microorganisme dans un liquide nourricier qu'il est nécessaire de souvent renouveler, ou lorsque, pour pouvoir exécuter une analyse chimique ou par d'autres motifs, il faut employer pour la culture de grandes quantités de liquide, et principalement lorsqu'on opère sur des ferments qui déterminent un grand dégagement d'air et une formation d'écume. Au laboratoire de Carlsberg, on les emploie dans des grandeurs variant de $^{1}/_{8}$ de litre à 1,25 lit. Ils peuvent naturellement être appropriés aux divers usages qu'on en fait.

Lorsque M. Pasteur parle d'une levûre pure ou qu'il se sert de la qualification „absolument pure“, il ne faut donc pas compendre par là qu'il s'agit d'une seule espèce de levûre, mais seulement que la soi-disant levûre pure est exempte de bactéries et de moisissures. Il ne dit lui-même rien de précis relativement à la limite de son procédé, et par suite on ne voit pas s'il l'a reconnue; mais ce que sa méthode a de défectueux apparaît surtout dans les parties du livre qui traitent de son „Dematium levûre“ (Sacch. Pastorianus), de sa „levûre caséeuse“ et de ses „levûres aérobies“.

Dans quelques endroits (par ex. p. 164 et 165), il dit sans détour que le Sacch. Pastorianus est une forme de développement d'une moisissure (Dematium) qu'on trouve en général sur les raisins; ailleurs (p. 170, 171 et 177), au contraire, il s'exprime en termes vagues et

l'on voit clairement qu'il n'est pas parvenu à trancher la question. Ce manque de clarté se manifeste aussi dans d'autres points de ses communications sur le Sacch. Pastorianus, par ex. p. 166, où il n'a pu décider si les cellules rondes et allongées observées par lui appartiennent réellement à la série du développement d'une même espèce.

Un autre point faible, ce sont également ses recherches sur la „levûre caséuse“, p. 196. M. Pasteur dit avoir obtenu cette singulière levûre de la manière suivante: un liquide formé d'un mélange de moût de bière, d'eau saturée de bitartrate de potasse et d'alcool est porté à l'ébullition dans un de ses ballons à deux tubulures, refroidi, puis ensemencé avec de la levûre haute des distilleries et des brasseries, et, après l'ensemencement, le ballon est porté et maintenu à 50^0 dans un bain d'eau pendant une heure. Ce traitement, il l'appelle une méthode pour l'épuration des levûres, mais on ne voit pas comment l'idée lui en est venue. Considérons maintenant le résultat qu'il a obtenu. Au bout de quelques jours, la fermentation s'est déclarée, plusieurs cellules ont commencé à se propager et il s'est développé une levûre très curieuse qu'il a appelée „levûre caséuse“ à cause du précipité caséeux qu'elle forme.

Ce que nous désirerions maintenant de savoir, c'est si cette nouvelle levûre provient d'une transformation des cellules de levûre haute ensemencées, ou si, au contraire, celles-ci ont été tuées par le traitement qu'on leur a fait subir, et si c'est une tout autre espèce de levûre qui a survécu, et, dans ce cas, une espèce qui, au commencement de l'expérience, se trouvait mêlée avec la levûre haute dont on s'est servi. Les recherches de M. Pasteur ne résolvent pas la question. Il semble cependant plutôt porté à admettre qu'on a affaire ici à une espèce étrangère qui, à l'origine, était mêlée avec la levûre haute. Ceux qui pourraient désirer de plus amples renseignements à ce sujet les trouveront dans un de mes prochains mémoires.

La partie du livre de M. Pasteur qui traite des „levûres aérobies“, p. 201 et suivantes, souffre de manques analogues à ceux que nous venons de mentionner, et c'est pourquoi ce serait seulement une répétition fatigante que de les relever ici en détail.

La voie par laquelle on peut en tout état de cause obtenir une culture à l'état de pureté, quelles que soient d'ailleurs les propriétés physiologiques et morphologiques des microorganismes sur lesquels on opère, s'offre en réalité d'elle-même et n'est autre que l'ensemencement d'une seule cellule dans un liquide nourricier préalablement stérilisé, dé manière qu'aucun organisme étranger ne puisse y pénétrer pendant la culture. Il serait fort difficile de dire qui a le premier énoncé cette idée en soi si simple et cependant si féconde. Plusieurs savants se sont efforcés, dans ces dernières années, de résoudre le problème chacun à sa manière.

M. Pasteur, dans son livre p. 193, indique le procédé suivant. Une portion de la levûre avec laquelle on opère est desséchée et puis réduite en fine poussière. On fait alors tomber d'une hauteur convenable un nuage de cette poussière, et ouvre en même temps quelques ballons vides d'air et renfermant un liquide nourricier stérilisé qui sont placés au-dessous (ces ballons sont décrits dans le 1er vol.

de ce Compte-rendu, p. 198). Si les circonstances sont favorables, il pourra arriver que des cellules de levûre vivantes pénètrent isolément dans quelques-uns des ballons — une dans chaque — et y fondent par suite de véritables cultures à l'état de pureté. M. Pasteur a été amené à cet ordre d'idées par la considération que chaque cellule, dans une portion de levûre appartenant à une seule et même espèce, et, par conséquent aussi, chaque cellule dans une colonie développée d'une seule cellule mère, devait avoir ses particularités individuelles, et qu'en cultivant chaque cellule à part, on pourrait obtenir un nombre égal de levûres d'espèce différente, chacune avec une cellule comme point de départ. D'après cette manière de voir, une petite portion de levûre doit par conséquent renfermer un nombre énorme de variétés et la possibilité d'un nombre plus grand encore. M. Pasteur n'avait pas cependant des caractères pour distinguer les unes des autres les levûres qui naissaient dans les ballons.

Comme on pouvait s'y attendre, son expérience ne lui a donné aucun résultat positif, et il semble résulter de son langage qu'il s'est borné à un essai provisoire. Cet essai n'a pas non plus été renouvelé ni par lui ni par d'autres.

Après avoir essayé de nous rendre compte des méthodes qu'a employées M. Pasteur pour préparer des cultures de Saccharomyces à l'état de pureté, nous devons rappeler qu'il y a sept ans que son célèbre ouvrage a paru; s'il l'avait écrit maintenant, il l'aurait certainement modifié sur plusieurs points.

On voit par ce qui précède que ma tâche devait être: *d'abord de perfectionner la méthode de manière à pouvoir obtenir des cultures provenant chacune d'une seule cellule, et ensuite de rechercher si ces cultures à l'état de pureté ont des caractères constants, et, dans ce cas, quels sont ces caractères.*

Dans un ballon Pasteur à deux tubulures renfermant de l'eau qui avait été portée à l'ébullition et puis refroidie, j'ai introduit une petite portion de la levûre dont je désirais obtenir une culture à l'état de pureté. Dans des cultures préliminaires, j'avais constamment pris soin non seulement qu'elle se composât de cellules jeunes et vigoureuses, mais aussi, autant que possible, que les cellules de l'espèce à isoler y fussent en grande majorité. Après avoir secoué assez fortement le ballon pour répartir les cellules uniformément dans l'eau, j'en ai pris des échantillons afin de déterminer par une numération avec l'hématimètre le nombre des cellules contenues dans 1 centimètre cube du mélange, et calculé ensuite combien il fallait ajouter d'eau pour que 1 c. c. du mélange définitif contînt, par ex., 0,5 de cellule. Par conséquent si, dans une série de ballons renfermant un liquide nourricier stérilisé, on sème dans chacun 1 c. c., il n'y en aura que la moitié qui recevront chacun une cellule. Ce procédé m'a donné de bons résultats. Il a cependant ses inconvénients; on n'a notamment aucune certitude que le ballon avec le mélange définitif renferme réellement le nombre de cellules donné par le calcul; il peut

même arriver qu'il ne s'y trouve pas une seule cellule, comme aussi qu'il en contienne plus qu'il ne devrait. La raison en est qu'il est très difficile d'obtenir une égale répartition des cellules dans les mélanges fortement dilués avec lesquels on finit par opérer, et la difficulté est d'autant plus grande que le nombre des cellules est plus petit par rapport à la quantité d'eau où elles se trouvent.

Pour éviter les dilutions, qui en outre prennent beaucoup de temps, on peut employer un autre procédé. Au milieu d'une lame de verre couvre-objet (Fig. 1), on grave un carré de 4 millim. de côté, par ex., et le subdivise en nombreux petits carrés d'une grandeur telle qu'on puisse embrasser l'un d'eux à l'aide de l'objectif dont il faut se servir pour pouvoir distinguer avec certitude une petite cellule de levûre. Les dimensions du grand carré sont déterminées par la condition qu'une petite goutte d'eau contenant des cellules de levûre doit pouvoir être placée en dedans de son périmètre, et, comme on se propose de compter ces dernières, il est bon que le carré soit aussi petit que possible, la numération se faisant d'autant plus vite qu'il est plus petit. Mais l'essentiel est de bien veiller à ce que la goutte ne dépasse en aucun point les limites du carré, car ce serait la même chose que de mettre la goutte sur une lame de verre ordinaire, et il n'y aurait par conséquent plus de contrôle. Lorsque la goutte est en place, elle ne doit pas être trop bombée, afin qu'on puisse voir avec certitude tout ce qu'elle contient. Les petits carrés servent de points de repère pour la numération. La différence entre cet appareil de numération et celui de Hayem conciste en ceci, qu'avec ce dernier on peut seulement fractionner la goutte, mais non déterminer par une numération directe ce que la goutte entière contient, tandis que cela devient possible avec ma lame de verre. Pour empêcher que l'eau ne s'évapore et que les cellules ne se dessèchent, il faut relier la lame avec sa goutte à une chambre humide. La mettre comme d'habitude sur un porte-objet ne peut se faire, car la goutte sortirait alors de ses limites. Avec les microscopes ordinaires, on se sert de la chambre humide de Bøttcher, dont la Fig. 2 donne une coupe verticale; *a* est la lame de verre avec sa goutte *b*, tournée en bas; *c*, la chambre et *d*, la couche d'eau qui empêche l'évaporation. En employant un microscope renversé de Nachet, on peut se servir de ma chambre humide, et la goutte est alors tournée en haut[1]). Dans un ballon renfermant de l'eau stérilisée, on introduit un peu de la levûre qui doit faire l'objet de l'expérience, et, après l'avoir secoué pour répartir uni-

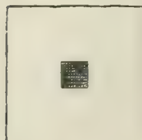


Fig. 1.

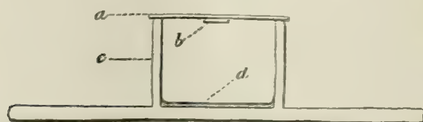


Fig. 2.

[1]) Emil Chr. Hansen, Chambre humide pour la culture des organismes microscopiques (Résumé du compte-rendu des travaux du Laboratoire de Carlsberg. 1er Vol. 1881 p. 184).

formément les cellules, on en enlève un petite goutte avec une mince tige de verre ou un fil de platine et la porte dans le grand carré gravé sur la lame de verre. Celle-ci est fixée à la chambre humide et l'on procède alors à la numération. Si la goutte est trop riche en cellules pour que la numération soit possible, il faut naturellement préparer un nouveau mélange plus fortement dilué; mais, avec un peu d'habitude, on pourra facilement éviter ce double travail. Le plus sûr est d'effectuer deux numérations et, si elles donnent des résultats concordants, on porte une goutte semblable à celle qui a servi pour la numération dans un ballon qui contient une certaine quantité préalablement pesée d'eau stérilisée. Le liquide qui doit servir à l'ensemencement est alors prêt et l'on sait qu'il contient, du moins à très peu de chose près, le nombre de cellules donné par le calcul.

La page 54 du texte danois, où la portée de la méthode est examinée, fait voir que, d'après le résultat des expériences, il y a seulement une certaine probabilité que quelques-uns des ballons ensemencés ont reçu chacun une cellule vivante. Il s'agit donc de trouver un caractère à l'aide duquel on puisse distinguer ces derniers des autres ballons infectés, et ce caractère nous est fourni par le nombre des taches de levûre qui se sont formées dans chacun ballon. Vu l'importance de cette observation pour l'analyse qui nous occupe, je l'ai déjà, l'année dernière, mentionnée dans ce Compte-rendu.

A partir du moment où un développement reconnaissable à l'œil nu se montre dans les ballons ensemencés, on observe assez facilement que, dans quelques-uns, il y a plusieurs taches de levûre, tandis que, dans tous les autres, il ne s'en trouve qu'une seule. Dans cette première période, elles apparaissent distinctement dans le liquide nourricier (dans ce cas, du moût de bière) encore clair. Suivant qu'on les regarde à la lumière transmise ou réfléchie, elles se présentent comme des taches sombres ou blanches qui ne nagent jamais dans le liquide, mais adhèrent toujours aux parois. Lorsque les ballons, sans être secoués, restent exposés, à la température ordinaire d'un appartement, on peut, au bout de quelques jours, observer ces taches et constater si le nombre en augmente ou non. Elles deviennent de plus en plus grandes, le liquide se sature peu à peu d'acide carbonique, de petites îles d'écume commencent à apparaître à la surface, la fermentation se déclare et le trouble et l'agitation qui en résultent dans le liquide mettent fin à l'examen macroscopique. Nous prenons alors les ballons qui, pendant toute la durée des observations, n'ont montré chacun qu'une seule tache de levûre; ce sont ceux qui renferment nos cultures à l'état de pureté, provenant chacune d'une seule cellule, ou, ce qui revient au même, d'une colonie de cellules unies entre elles et formant un tout. La preuve de l'exactitude de ma conclusion, qu'une seule tache dans un ballon ne peut provenir que d'une seule cellule est indirecte. En effet, si l'on suppose que, dans un de nos ballons avec du moût de bière, on introduise deux ou plusieurs cellules de levûre vigoureuses et isolées les unes des autres, ces cellules, pendant que le ballon, comme l'expérience l'exige, est fortement secoué pour que le liquide d'ensemencement se mélange bien avec le moût, se

séspareront en général encore davantage, et, si elles viennent à se propager, chacune d'elles formera son centre de végétation à part. Lorsque le liquide est rentré en repos, elles tombent en effet au fond et il n'est guère probable qu'elles aillent se fixer au même point. Si la végétation, dans un ballon renfermant une tache de levûre, se fixe à la paroi inclinée du ballon, et non au fond, c'est un nouveau signe qu'il n'a, à l'origine, reçu qu'une cellule, et les ballons de cette espèce sont précisément nombreux. Par conséquent, tandis qu'un centre de végétation dans un ballon signifie qu'il y a été semé une cellule vivante, on ne peut dire réciproquement que plusieurs centres de végétation soient en général dus à l'ensemencement de plusieurs cellules. Il n'est pas rare qu'un ballon qui n'a reçu qu'une cellule présente bientôt plusieurs centres de végétation. Survient-il en effet dans le liquide une agitation, même assez faible, après que cette cellule a par bourgeonnement formé une colonie, les cellules nouvellement nées se sépareront facilement pour fonder chacune leur centre de végétation. Il suit de là que, dans nos expériences, il y a eu d'ordinaire plus de cultures à l'état de pureté que nous n'en avons constaté.

Lorsque, dans mes recherches sur le genre Saccharomyces, je me sers du mot „espèce", j'entends par là une végétation que j'ai cultivée de différentes manières pendant plus d'une année, et qui, aussi longtemps que je l'ai observée, a toujours conservé certains caractères déterminés par lesquels elle pouvait être distinguée des espèces voisines. Quant à la question de savoir ce qu'il faut comprendre par species, variété, race ou modification, je ne l'aborderai pas dans ce mémoire et ne la traiterai que plus tard quand j'aurai terminé ces recherches. Je laisserai aussi en suspens, pour le moment, cette autre question, si les cellules végétatives, avec leurs ascospores, sont des organismes qui ont terminé leur évolution, ou seulement des formes d'un cycle plus étendu.

Peu après avoir commencé à employer la méthode décrite plus haut, je l'ai soumise à une épreuve facile en l'appliquant au Sacch. apiculatus, espèce caractérisée par sa forme bien définie et ses particularités physiologiques. Des cellules de cette espèce furent mélangées dans l'eau d'ensemencement avec des cellules de levûre ordinaire des brasseries, après quoi on les sema de la manière que j'ai décrite dans une série de ballons renfermant du moût de bière stérilisé. L'expérience terminée, quelques-uns des ballons ensemencés ne renfermaient que des cellules ovales semblables à celles de la levûre des brasseries, et les autres, que des cellules en forme de citron, appartenant au Sacch. apiculatus.

Relativement à plusieurs détails tant ici qu'ailleurs, je dois me référer au texte danois.

Dans son mémoire sur les méthodes de recherche des microorganismes [1]), M. Koch relève fortement l'importance qu'un substratum solide a pour leur culture. Comme tel, il emploie soit des tranches

[1]) Robert Koch, Zur Untersuchung von pathogenen Organismen (Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte. I B. 1881. p. 18).

de pommes de terre, soit un mélange de gélatine avec un liquide nourricier stérilisé par l'ébullition. Pendant une visite que je fis, en 1882, dans son laboratoire, j'eus l'occasion de voir que son procédé pouvait donner de bons résultats en ce qui concerne l'étude des bactéries. C'est pourquoi j'essayai, à mon retour, de l'appliquer aux Saccharomyces. Pour m'assurer si, par ce moyen, on pouvait réellement en obtenir des cultures à l'état de pureté, je choisis deux espèces faciles à distinguer au microscope, à savoir le Sacch. apiculatus et le Sacch. cerevisiæ, et les portai dans un mélange de gélatine et de moût de bière maintenu liquide dans un bain d'eau chauffé à 30—35° C. Après avoir été secoué, pour que les cellules s'y répartissent autant que possible également, le mélange fut versé sur une plaque de verre préalablement passée à travers une flamme, et celle-ci, placée ensuite sous une cloche humide. Au bout de 2—3 jours, on put voir distinctement quelques petites taches grisâtres, et le 8e jour il s'était formé une touffe assez notable de moisissures. Après examen de la plaque, je constatai que le Penicillium glaucum était le seul organisme étranger qui se fût glissé dans la culture. La plaque contenait 70 taches de levûre dont la moitié environ appartenant à chaque espèce. Une seule tache (par conséquent 1,4 % du nombre total) renfermait les deux espèces de levûre, et le Sacch. cerevisiæ formait la couche supérieure, tandis que le Sacch. apiculatus était refoulé dans la couche inférieure, ce qui s'explique facilement, puisqu'il est le plus faible des deux. Lorsque, à l'aide du microscope, on veut reconnaître si une pareille tache est pure ou non, il ne faut jamais se contenter d'en examiner la couche supérieure, car si elle est formée par plusieurs organismes, on ne trouvera en général que le plus fort d'entre eux, comme tous les autres plus faibles ont été repoussés dans les couches inférieures. En répétant mon expérience avec le Sacch. apiculatus et une des espèces qui peuvent être rapportées au Sacch. Pastorianus, j'ai en somme obtenu le même résultat. Autant que je sache, ni M. Koch ni personne autre n'ont soumis la méthode à un contrôle de ce genre.

On voit donc par là que, dans la plupart des cas, les cellules de levûre ont été séparées et ensemencées chacune à part, et que les taches qu'elles ont formées renferment presque toujours des cultures à l'état de pureté. La question est maintenant de savoir comment on peut éviter les végétations impures qui se produisent comme des exceptions menaçantes. L'examen microscopique n'est applicable que dans les cas où l'on a affaire avec des formes caractéristiques telles que celles dont je me suis servi, mais, vis-à-vis du grand groupe des espèces à cellules ovales et en forme de boudin, on n'arrive à rien par cette voie. De même que dans mes expériences antérieures pour préparer des cultures à l'état de pureté, on est d'autant moins exposé à commettre des erreurs que l'espèce recherchée est plus prédominante dans la levûre qu'on emploie. Le résultat est naturellement le même en répétant l'expérience de manière que la première devienne le point de départ de la deuxième, la deuxième, de la troisième, etc. Cependant cette méthode ne donne pas une certitude pleinement satisfai-

sante; on opère toujours un peu à l'aventure et ne possède aucun moyen de contrôle qui puisse indiquer si l'on a ou non atteint le but.

Pour obtenir des cultures à l'état de pureté à l'aide de la gélatine, il faut que les cellules soient suffisamment isolées les unes des autres, de manière que les colonies développées par bourgeonnement ne puissent se fusionner. Le nombre des cellules doit donc être assez petit par rapport à la masse de la gélatine (v. le texte danois p. 59—60).

La seule voie par laquelle nous puissions obtenir la certitude absolue qu'une tache est formée d'une ou de plusieurs cellules, est d'entreprendre une culture dans une chambre humide. J'ai fait l'expérience de la manière suivante: quelques cellules de levûre ayant, comme à l'ordinaire, été bien réparties dans de la gélatine nutritive lîquide, je répandis une couche assez mince du mélange sur une lame de verre couvre-objet, qui fut ensuite fixée à l'une des chambres mentionnées p. 24 avec la couche de gélàtine tournée en bas. Le couvre-objet, la chambre, en un mot tous les appareils dont je me servais, avaient préalablement été passés à travers une flamme. La gélatine une fois solidifiée, je cherchai, par exemple, deux cellules qui eussent un aspect vigoureux et dont la place dans la préparation fût favorable au développement de colonies séparées, et, après en avoir noté la position, je plaçai la chambre dans un thermostat chauffé à 25° C. Au bout de quelques heures, le bourgeonnement était en pleine activité. En soumettant, à de courts intervalles, la préparation à un examen microscopique, je pus suivre pas à pas le développement et constater sûrement si les colonies qui se développaient successivement provenaient d'une ou de plusieurs cellules. Au bout de 24 heures, les taches pouvaient se distinguer à l'œil nu; elles étaient rondes et gris clair; 12 heures plus tard, elles étaient aussi grandes que de petites têtes d'épingles. Dans ces dernières phases, l'examen est très facile et conciste simplement à voir si, dans le voisinage des colonies, il s'en forme d'autres pouvant se fusionner avec celles qui ont déjà été observées. Comme notre gélatine forme un fond solide où les cellules semées sont emprisonnées, peu importe qu'il y en ait plusieurs, pourvu seulement que quelques-unes d'entre elles soient suffisamment isolées pour pouvoir chacune fonder leur colonie sans qu'une fusion avec d'autres puisse survenir. Cette fusion aurait au contraire lieu si l'on se servait d'un liquide pour les cultures; le but ne saurait alors être atteint qu'en semant une seule cellule, et par suite le problème serait rendu beaucoup plus difficile. La méthode de M. Koch, avec la modification que nous venons de décrire, fournit un moyen parfaitement sûr d'obtenir une culture à l'état de pureté. Après que les taches ainsi observées étaient devenues plus distinctes, on prenait dans chacune d'elles, avec un fil de platine préalablement passé à travers une flamme, quelques cellules qu'on introduisait rapidement dans des ballons renfermant du moût de bière stérilisé.

Dans ces expériences avec la gélatine, l'incertitude ne survient qu'au moment où la lame de verre couvre-objet est enlevée de la chambre humide et où les cellules sont introduites dans les ballons,

car une infection des organismes de l'air est alors possible. Mais ce danger n'est guère à craindre si l'on opère rapidement dans une pièce propre et un air tranquille. C'est ce que montrent les recherches décrites dans le texte danois, p. 62.

Dans mes recherches sur les ferments alcooliques, j'ai traité un assez grand nombre d'espèces. J'en ai puisé les matériaux pour la plus grande part dans le voisinage du laboratoire, dans les jardins attenants, dans les brasseries et les distilleries de Copenhague; mais j'en ai aussi reçu beaucoup de l'étranger, et en ai rapporté moi-même encore davantage d'un voyage dans les Vosges, où je passai le temps des vendanges pour étudier la fermentation du vin. Comme procédé à la fois bon et très commode pour conserver en voyage des échantillons de levûre, je puis recommander le suivant: la levûre en question est versée sur un petit morceau de papier brouillard, qui est ensuite plié comme deux feuillets d'un livre de manière qu'elle forme entre eux une couche très mince. A l'aide d'un autre morceau du même papier on absorbe autant que possible la partie liquide, et la préparation est ensuite mise dans une double enveloppe, également de papier brouillard. Ce papier doit, dans tous les cas, être passé à travers une flamme avant qu'on s'en serve. La préparation ainsi bien empaquetée reste pendant une semaine, à la température ordinaire d'un appartement, exposée à l'action de l'air, après quoi on ôte l'enveloppe extérieure pour éloigner les poussières que l'air y a déposées, et la levûre, qui est alors presque sèche, peut dans cet état être gardée plusieurs mois dans un tiroir sans que les cellules meurent. Si, comme il arrive souvent en voyage, on n'a pas le temps de laisser sécher la préparation dans une chambre, il n'y a aucun risque à la mettre tout de suite dans sa malle, surtout si l'on a d'abord eu soin d'en exprimer autant que possible l'humidité avec du papier brouillard. A l'aide de ce procédé, on peut, à peu de frais et sans beaucoup de peine, expédier au loin des échantillons de levûre dans une enveloppe de lettre ordinaire. Une grande partie des matériaux que j'ai employés pour mes études m'ont été envoyés de cette manière au laboratoire.

Pour conserver pendant longtemps de pareils échantillons, j'ai également, avec succès, employé un liquide stérilisé qui se composait de moût de bière ordinaire, additionné de 10 vol. % d'alcool et d'un peu d'eau saturée de bitartrate de potasse. Comme les cellules de levûre qu'on y met provoquent régulièrement une légère fermentation, il faut que les flacons qui renferment le mélange ne soient remplis qu'à moitié. Une qualité essentielle de ce liquide, c'est qu'on n'est pas incommodé par une fermentation un peu forte; aussi peut-on boucher les flacons aussitôt après y avoir introduit la levûre sans qu'une explosion soit à craindre. Il a par là un avantage sur les dissolutions de saccharose, qui du reste sont aussi propres à conserver pendant longtemps des levûres.

Par le premier de ces procédés, les cellules ont souvent conservé leur vigueur pendant 20 mois, et il est possible que quelques espèces puissent vivre encore plus longtemps dans ces conditions. Des cellules jeunes et vigoureuses se conservent d'ordinaire plus longtemps que des

cellules vieilles et faibles de la même espèce. Dans aucun de mes échantillons, les cellules ne sont mortes avant l'expiration des 5 premiers mois. Si, à l'origine, un des échantillons renfermait plusieurs espèces, et que l'une d'elles y fût prédominante, celle-ci continuait aussi généralement à l'être dans la végétation qui se produisait, lorsque la préparation avait été semée pendant les 2—3 premiers mois dans un liquide nourricier. Tardait-on au contraire plus longtemps, il n'était pas rare que les cellules qui prenaient naissance fussent, soit exclusivement soit en majeure partie, d'une espèce tout autre que celle qu'on avait attendue, et par conséquent d'une espèce qui, au début de l'expérience, constituait un élément secondaire de la levûre séchée. La raison en est que les différentes espèces ne supportent pas également le séchage; les unes s'affaiblissent plus que d'autres, et il y a aussi une différence quant au temps pendant lequel elles peuvent vivre après avoir été séchées comme je l'ai dit.

Les cellules de levûre se maintiennent aussi bien dans le liquide nourricier alcoolique et acide mentionné plus haut que dans les préparations avec du papier brouillard. Que, dans ces conditions, les diverses espèces se comportent aussi entre elles d'une manière différente, c'est fort probable; mais je ne m'en suis pas assuré expérimentalement.

Les cultures décrites plus loin, que j'ai entreprises pour amener des cellules de levûre à développer des ascospores, ont, sauf indication contraire, toutes été pratiquées à l'aide des blocs de plâtre mentionnés p. 14 et avec des cellules jeunes et vigoureuses. L'ensemencement était préparé de la manière suivante: après que les cellules choisies avaient été cultivées pendant quelque temps dans du moût de bière (env. 14 % Ball.) à la température ordinaire d'un appartement, on semait un peu de levûre jeune dans un autre moût de la même qualité que le précédent, et la cultivait pendant 24 heures à 26—27° C. Les cellules ainsi obtenues étaient semées sur les blocs de plâtre, et lorsque ceux-ci s'étaient saturés d'humidité, ce qu'indiquaient leurs surfaces devenues un peu brillantes, on les exposait dans un thermostat à des températures convenables. Mon but était de me rendre compte de l'influence de la température sur la formation des ascospores, et ensuite de constater si, sous ce rapport, les espèces se comportaient ou non de la même manière, et, s'il y avait des différences, de les déterminer. Je devais ainsi, pour chacune de mes cultures à l'état de pureté mentionnées plus haut, rechercher à quelles températures le développement des ascospores cessait de se produire, par conséquent trouver les températures limites, puis déterminer la température optimum et enfin, pour compléter la courbe, entreprendre des recherches sur un nombre suffisant de températures intermédiaires. Pour obtenir un point de repère aussi sûr que possible, j'ai, pour mes déterminations, choisi le moment où, dans mes cultures, il est possible, pour la première fois, de découvrir des

rudiments certains. Ce que j'entends par là est représenté sur la Pl. III, Fig. 1 et 6 c. Il semble au premier abord qu'il eût mieux valu prendre pour point de repère le moment où la spore mûre était développée; mais il n'est guère possible de déterminer ce moment avec certitude, ni en général de voir si une spore est mûre ou non. Le moment que j'ai choisi ne présente pas de telles difficultés.

Les ascospores se développent également lorsque les cellules de levûre sont à la surface d'une couche de gélatine solide stérilisée, qui, tant que dure l'expérience, est maintenue humide. Il est commode de se servir pour cela de lames de verre porte-objet, sur lesquelles on répand la gélatine liquide en couche pas trop mince; peu importe qu'elle soit mélangée ou non avec un liquide nourricier, car, dans les deux cas, j'ai obtenu une riche production d'ascospores. On peut, en les disposant dans un cadre, placer un assez grand nombre de ces lames de verre sous la même cloche. C'est un moyen relativement rapide et commode pour entreprendre à la fois une nombreuse série d'expériences.

J'ajouterai enfin qu'en cultivant quelques espèces dans de l'eau de levûre que j'aérais de temps à autre, j'ai aussi obtenu des ascospores.

Expériences.

Les six formes avec lesquelles ont été exécutées les expériences suivantes peuvent être rapportées à trois anciennes espèces: le Sacch. cerevisiæ, le Sacch. Pastorianus et le Sacch. ellipsoideus. Je les désignerai provisoirement ainsi:

Sacch. cerevisiæ I.

Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus II, Sacch. Pastorianus III

Sacch. ellipsoideus I, Sacch. ellipsoideus II.

Leurs cultures à l'état de pureté ont été obtenues à l'aide des méthodes exposées plus haut.

D'après l'ancien schéma, on pourrait bien, avec ces six formes, établir tout de suite trois ou peut-être quatre espèces distinctes, et alors peu importeraient celles à qui on appliquerait les noms de M. Reess. De chacune des espèces ci-dessus mentionnées (je les appellerai de ce nom pour abréger, mais sans préjuger les résultats des recherches), il peut en effet, par un traitement convenable, se développer des formes qui se laissent rapporter à toutes les species productrices d'ascospores qui figurent dans la classification de M. Reess. Les caractères indiqués par M. Pasteur ne sont pas non plus suffisants.

Les groupements qui précèdent signifient seulement que les levûres désignées sous le même nom spécifique peuvent être rapportées à l'espèce de même nom chez M. Reess, mais il ne s'ensuit nullement que les espèces rapportées au même groupe aient la même origine et dérivent de la même racine. Je me réfère de nouveau ici à mes remarques, p. 26, sur les species, les variétés et les modifications.

Mes mémoires ultérieurs traiteront successivement d'un plus grand nombre d'espèces, et les recherches nécessaires une fois termi-

nées, j'indiquerai les limites ainsi trouvées des species existantes et donnerai à ces dernières des noms systématiques.

Dans ce qui suit, les six espèces sont examinées dans l'ordre où je les ai nommées; les figures correspondantes sur les planches sont également disposées dans le même ordre.

Sacch. cerevisiæ I.

Cette espèce constituait la principale partie d'une levûre haute que je reçus, il y a quelques années, d'une brasserie d'Edimbourg, et plus tard aussi d'une brasserie de Londres. C'est une forme vigoureuse de levûre haute. Sur la planche III Fig. 1, sont représentés des exemples de cellules avec des ascospores. Celles-ci, comme chez tous les Saccharomyces, sont grisâtres aussi bien à la lumière transmise que réfléchie et plus ou moins sphériques. La grandeur en varie de $2^1/_2$ à 6 micromillim. Les points extrêmes sont cependant rares. On en trouve en général 1—4 dans chaque cellule mère, et ce n'est que tout exceptionnellement que j'en ai observé 5 (voir Fig. 1 b). Les parois des spores y sont ordinairement plus distinctes que chez les espèces suivantes. Les spores de ces dernières ont certainement aussi un pouvoir réfringent plus grand que celles de l'espèce dont il s'agit.

Comme chez toutes les espèces, c'est chose fort ordinaire que les ascospores d'une même cellule mère ont des grandeurs différentes. J'ai également souvent observé que la même cellule mére a à la fois développé des ascospores et poussé un bourgeon. Les figures de quelques-unes des espèces suivantes montrent même la cas où non seulement la cellule mère, mais aussi le bourgeon, a développé des ascospores. Le groupement des ascospores est le même chez toutes les espèces, et on trouvera indiqués sur les figures plusieurs exemples des modifications qui peuvent s'y produire.

La Fig. 1 c représente des cellules avec des ascospores non développées, c'est-à-dire dans la phase qui, nous l'avons dit plus haut, a été employée pour constater le temps que demande le développement des ascospores, lorsque les cellules végétatives sont, dans les conditions décrites, soumises à l'influence d'une température déterminée. La Fig. 1 a est une forme particulière de développement qui est fréquente. Les cellules sont divisées ici par des cloisons en plusieurs parties qui peuvent chacune pousser des bourgeons. J'ai, dans mes notes, désigné ce développement sous le nom de formation cloisonnée, et je l'appellerai de même chez les autres espèces où je l'ai observé. Quant à dire comment il se produit et quelle en est la signification, c'est une question dont mes autres travaux ne m'ont pas encore laissé le temps d'entreprendre l'étude. Il est probable que quelques-uns de mes devanciers ont aussi observé ces formations, mais les ont confondues avec la production proprement dite des ascospores.

Le tableau ci-dessous indique avec quels intervalles se produit le développement des ascospores, lorsque les cellules végétatives sont soumises au traitement mentionné p. 30, traitement qui a été le même pour le Sacch. cerevisiæ I que pour les cinq espèces suivantes.

A $37^1/_2{}^0$ C. aucun développement d'ascospores.
- 36-37^0 C. apparition des premiers rudiments distincts au bout de 29 heures.
- 35^0 C. . . . . 25 —
- $33^1/_2{}^0$ C. . . . . 23 —
- 30^0 C. . . . . 20 —
- 25^0 C. . . . . 23 —
- 23^0 C. . . . . 27 —
- $17^1/_2{}^0$ C. . . . . 50 —
- $16^1/_2{}^0$ C. . . . . 65 —
- $11-12^0$ C. 10 jours.
- 9^0 C. aucun développement d'ascospores.

Sacch. Pastorianus I.

Sous ce nom est désignée une levûre que j'ai souvent recueillie dans les poussières de l'air, dans une brasserie de Copenhague[1]). Cultivée dans du moût, elle produit une fermentation basse et développe des cellules qui ressemblent aux figures de la Pl. XI dans les „Etudes sur la bière", de M. Pasteur, et aux Fig. 11—12 Pl. II dans les „Botanische Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze" de M. Reess. Les ascospores (voir ma Planche III Fig. 2) ont en général une grandeur de $1^1/_2$ à $3^1/_2$ micromillim.; il est extrêmement rare que leur diamètre atteigne 5 micromillim. On en trouve le plus souvent dans chaque cellule le nombre qui est normal pour les Saccharomyces, à savoir 1—4, mais assez fréquemment aussi il se rencontre des cellules qui en renferment davantage, à savoir 5—10. La Fig. 2 b en donne des exemples. J'ai aussi, chez cette espèce, observé la formation cloisonnée (Fig. 2 a).

A $31^1/_2{}^0$ C. aucun développement d'ascospores.
- $29^1/_2-30^1/_2{}^0$ C. apparition des premiers rudiments distincts au bout de 30 h.
- 29^0 C. . . . . 27 -
- $27^1/_2{}^0$ C. . . . . 24 -
- $23^1/_2{}^0$ C. . . . . 26 -
- 18^0 C. . . . . 35 -
- 15^0 C. . . . . 50 -
- 10^0 C. . . . . 89 -
- $8^1/_2{}^0$ C. . . . . 5 j.
- 7^0 C. . . . . 7 -
- $3-4^0$ C. 14 -
- $^1/_2{}^0$ C. aucun développement d'ascospores.

---

[1]) Emil Chr. Hansen, Recherches sur les organismes qui, à différentes epoques de l'année, se trouvent dans l'air, à Carlsberg et aux alentours, et qui peuvent se développer dans le moût de bière. (Résumé du Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg. 1 vol. 4 livraison 1882 p. 197).

Sacch. Pastorianus II.

Comme la précédente, cette espèce a été assez ordinairement observée dans les analyses que j'ai faites, dans les années 1878—1881, des poussières de l'air dans la brasserie de Copenhague ci-dessus mentionnée. Sa végétation dans le moût répond également aux figures citées du Sacch. Pastorianus de MM. Pasteur et Reess. Comparée avec la précédente, ses cellules sont en général un peu plus grandes; mais la différence n'est pas marquée, et mélange-t-on les deux espèces, il devient impossible de distinguer au microscope si l'on en a devant soi une ou plusieurs. En opposition avec le Sacch. Pastorianus I, il produit de faibles phénomènes de fermentation haute. Il doit donc différer de l'espèce avec laquelle M. Pasteur a expérimenté, car il est dit de celle-ci dans les „Études sur la bière“ qu'elle est une levûre basse. Ses ascospores sont représentées dans ma Fig. 3. On voit en *a* les formations cloisonnées, en *b* deux cellules avec un nombre d'ascospores plus grand que le chiffre normal; il y en a 6 dans l'une et 7 dans l'autre, et au-dessus de ces deux, à gauche, est représentée une cellule en forme de boudin, qui en renferme 5. Cette dernière montre que les ascospores peuvent atteindre une grandeur notable, même lorsque la cellule mère en a engendré plus qu'à l'ordinaire. Leur grandeur varie de 2 à 5 micromillim.; les points extrêmes sont rares, surtout en ce qui concerne les diamètres de 4—5 micromillim.

A 29° C. aucun développement d'ascospores.
- 27-28° C. apparition des premiers rudiments distincts au bout de 34 h.
- 25° C. . . . . 25 -
- 23° C. . . . . 27 -
- 17° C. . . . . 36 -
- 15° C. . . . . 48 -
- 11½° C. . . . . 77 -
- 7° C. . . . . 7 j.
- 3-4° C. . . . . 17 -
- ½° C. aucun développement d'ascospores.

Sacch. Pastorianus III.

J'ai retiré cette espèce d'une bière basse de Copenhague qui était attaquée de la maladie qu'on appelle trouble de la levûre. Elle produit des phénomènes de fermentation haute plus marqués que l'espèce précédente. Les cellules qu'elle développe dans le moût ont le même aspect que celles des deux autres espèces appartenant à ce groupe, et ressemblent surtout au Sacch. Pastorianus I. Dans les cultures sur les blocs de plâtre, elles donnent naissance non seulement à des ascospores (Fig. 4), mais aussi, comme les précédentes, à des formations cloisonnées (Fig. 4 a); il y en avait également qui renfermaient chacune 5—10 ascospores (Fig. 4 b). Les spores mesuraient 2—4 micromillim. Les diamètres de 3½—4 étaient rares.

A 29° C. aucun développement d'ascospores.
- 27—28° C. apparition des premiers rudiments distincts au bout de 35 h.
- 26½° C. . . . . 30 -
- 25° C. . . . . 28 -

A 22° C. apparition des premiers rudiments distincts au bout de 29 h.
- 17° C. .... 44 -
- 16° C. .... 53 -
- $10^1/_2$° C. .... 7 j.
- $8^1/_2$° C. .... 9 -
- 4° C. aucun développement d'ascospores.

Sacch. ellipsoideus I.

Cette espèce a été trouvée avec d'autres Saccharomyces à la surface de raisins mûrs que j'avais cueillis dans les Vosges pendant le temps des vendanges. Cultivée dans le moût de bière ou de vin, elle développe des cellules qui ressemblent beaucoup aux dessins que MM. Reess et Pasteur ont donnés du Sacch. ellipsoideus (ferment alcoolique ordinaire du vin, de Pasteur). De même que celles des autres espèces, elles peuvent prendre la forme de boudin et, en général, changer de forme, suivant les divers traitements auxquels on les soumet. Les déterminations de MM. Reess et Pasteur donnent donc tout aussi peu ici qu'ailleurs, dans ce domaine, des points de repère certains.

La Fig. 5 représente des spores, et la Fig. 5 a, une formation cloisonnée. Le diamètre des spores est de 2—4 micromillim., très rarement cependant de $3^1/_2$—4.

A $32^1/_2$° C. aucun développement d'ascospores.
- $30^1/_2$-$31^1/_2$° C. apparition des premiers rudiments distincts au bout de 36 h.
- $29^1/_2$° C. .... 23 -
- 25° C. .... 21 -
- 18° C. .... 33 -
- 15° C. .... 45 -
- $10^1/_2$° C. .... $4^1/_2$ j.
- $7^1/_2$° C. .... 11 -
- 4° C. aucun développement d'ascospores.

Sacch. ellipsoideus II.

Cette espèce se trouvait dans la bière malade mentionnée plus haut avec le Sacch. Pastorianus III et un Sacch. cerevisiæ. Les cellules cultivées dans le moût de bière ressemblent aussi bien au Sacch. ellipsoideus I qu'au Sacch. cerevisiæ. La Fig. 6 représente des cellules avec des ascospores mûres, la Fig. 6 c, des cellules avec des rudiments d'ascospores; c'est cette phase du développement qui a servi pour les déterminations du tableau ci-dessous. Les ascospores mesuraient 2—5 micromillim., les diamètres de 4—5 étaient comme d'habitude très rares.

A 35° C. aucun développement d'ascospores.
- 33—34° C. apparition des premiers rudiments distincts au bout de 31 h.
- 33° C. .... 27 -
- $31^1/_2$° C. .... 23 -
- 29° C. .... 22 -

A 25⁰ C. apparition des premiers rudiments distincts au bout de 27 h.
- 18⁰ C. . . . . 42 -
- 11⁰ C. . . . . $5^1/_2$ j.
- 8⁰ C. . . . . 9 -
- 4⁰ C. aucun développement d'ascospores.

Dans les figures citées plus haut, je me suis efforcé, autant que possible, de donner des exemples des différentes formes de cellules à ascospores que peuvent développer les espèces dont il s'agit lorsqu'on les cultive de la manière que j'ai décrite. Elles ont aussi été dessinées d'après de nombreuses préparations, et reproduisent par conséquent non seulement les cas les plus fréquents, mais aussi les exceptions.

Un coup d'œil jeté sur la planche III montre qu'on peut retrouver essentiellement les mêmes formes, les mêmes groupements et les mêmes dimensions chez toutes les espèces. Cependant les spores du Sacch. cerevisiæ I atteignent une grandeur qui dépasse un peu celle observée jusqu'ici chez les autres espèces, à savoir 6 micromillim., tandis que le diamètre maximum des spores de ces dernières est de 5 micromillim.; mais, à partir de ce point extrême, on rencontre aussi, chez le Sacch. cerevisiæ I, une série de spores dont le diamètre descend successivement jusqu'à 2 micromillim. environ. Nous avons donc également chez cette espèce les grandeurs qui sont fréquentes chez les cinq autres, à savoir $3^1/_2$—$2^1/_2$ micromillim. Chez le Sacch. Pastorianus I, j'ai observé des spores qui mesuraient seulement $1^1/_2$ micromillim., par conséquent $^1/_2$ micromillim. de moins que les spores les plus petites des autres espèces; mais je ne doute pas qu'en poursuivant ces recherches, on n'arrive aussi à trouver chez celles-ci, et notamment chez les trois dernières, des spores tout aussi petites.

Si nous nous figurons les spores représentées sur la planche III mélangées les unes avec les autres, et que nous n'ayons pour nous guider que les spores elles-mêmes, par conséquent leurs dimensions, leur groupement dans la cellule mère et leur aspect, nous n'apprendrons pas grand' chose sur les espèces contenues dans ce mélange. Nous rapporterons au Sacch. cerevisiæ I les quelques grandes spores de 6 micromillim. et au Sacch. Pastorianus I les petites qui n'en mesurent que $1^1/_2$; mais cela fait, nous serons au bout de notre savoir, et, comme il a été dit plus haut, nous ne sommes pas même assuré de l'exactitude de ces deux points. Quant aux autres spores, nous ne pouvons avoir la moindre idée de la manière dont il faut les classer.

Si, au contraire, nous nous en tenons à l'ancienne méthode et la prenons pour guide, nous pourrons, dans les formes et les dimensions des cellules d'une seule et même espèce à ascospores, trouver des exemples de toutes ou du moins de la plupart des espèces à ascospores du système. La Fig. 2 le montre clairement. On y trouve des cellules qui peuvent être rapportées au Sacch. cerevisiæ, au Sacch. ellipsoideus, au Sacch. exiguus et au Sacch. Pastorianus, par conséquent quatre espèces représentées en une seule. Les autres figures fournissent aussi des exemples analogues. Si le système de M. Reess

est soumis ici à une critique, il ne faut pas oublier que son livre était pour son époque un travail plein de mérite; on y trouve notamment une attaque très habile contre les exagérations alors régnantes de la doctrine du pléomorphisme chez les champignons.

De ce qui précède, nous pouvons déjà conclure que ni la forme, ni la grandeur, ni l'aspect d'une cellule ne sont suffisants pour donner les caractères de l'epèce, et qu'il en est de même des ascospores.

Mais, considérée à un autre point de vue, la forme de la cellule fournit des caractères importants. J'ai déjà mentionné, aussi bien dans ce mémoire que dans une première communication de 1882, concernant les nouvelles méthodes pour l'étude des Saccharomyces, que les cellules des différentes espèces, lorsqu'elles sont soumises à un certein traitement, peuvent prendre différentes formes, de sorte, par ex., que des cellules ovales sont obligées de développer des cellules allongées et celles-ci, des cellules ovales. C'est encore ici la manière différente dont les espèces réagissent contre les mêmes influences extérieures qui nous donne de précieux renseignements.

Les expériences communiquées plus haut sur le développement des ascospores ont montré qu'il est dépendant de la température, de telle sorte que, dans les limites où il peut avoir lieu, il se produit lentement à une basse température et s'accélère, à mesure que celle-ci s'élève, jusqu'à un certain point à partir duquel il se ralentit de nouveau pour s'arrêter bientôt. Chez aucune des six espèces examinées, ce développement n'a été observé à des températures plus basses qu'entre $^1/_2$ et 3^0 C., et la température la plus haute à laquelle il se soit encore produit était voisine de $37^1/_2{}^0$ C. La marche du développement, chez les six espèces, est représentée sur les Pl. I et II par autant de courbes désignées chacune par le nom de l'espèce correspondante, et ayant pour abscisses les températures et pour ordonnées le temps que chacune d'elles exige pour le développement des ascospores. Les six courbes ont une forme analogue. A partir de l'ordonnée correspondant à la température la plus basse, elles se rapprochent de l'axe des abscisses et s'en éloignent ensuite un peu; mais les points déterminés par les températures maxima et minima fournissent des caractères distinctifs entre les espèces.

Chez le Sacch. cerevisiæ I, ce développement s'arrête ainsi à une température comprise entre 9 et 11^0 C. et à $37-37^1/_2{}^0$ C.

Chez le Sacch. Pastorianus I, il s'arrête à des températures comprises entre $^1/_2$ et 3 et entre $30^1/_2$ et $31^1/_2{}^0$ C.

Chez le Sacch. Pastorianus II, la température minimum est également comprise entre $^1/_2$ et 3^0 C., mais la température maximum est plus basse que chez le précédent et voisine de 28^0 C.

Le Sacch. Pastorianus III a le même maximum que le Sacch. Pastorianus II; mais sa température minimum est différente et comprise entre 4 et $8^1/_2{}^0$ C.

On a aussi trouvé la même température minimum chez les Sacch. ellipsoideus I et II, mais la température maximum est, chez le

premier, comprise entre $31^1/_2$ et $32^1/_2$ et, chez le second, entre 34 et 35° C.

La température optimum, voisine de 30° C. chez le Sacch. cerevisiæ I, était un peu plus basse chez le Sacch. ellipsoideus II.

Chez le Sacch. Pastorianus I, je l'ai observée dans le voisinage de 27° C., et chez les Sacch. Pastorianus II et III et ellipsoideus I, aux environs de 25° C.

Près du maximum, le développement des ascospores exigeait 30 heures ou davantage. Dans le voisinage de 25° C., il n'y avait pas grande différence dans le temps qu'il demandait chez les espèces examinées. Mais, aux basses températures, cette différence était plus marquée. Elle devient surtout très frappante lorsqu'on compare le temps du développement à $11^1/_2$° C., chez le Sacch. cerevisiæ I, avec le temps correspondant chez les autres espèces. A cette température, le Sacch. cerevisiæ I avait en effet besoin de 10 jours pour développer des ascospores, tandis que les Sacch. Pastorianus I et II en demandaient moins de 4, le Sacch. Pastorianus III, moins de 7, le Sacch. ellipsoideus I, moins de $4^1/_2$ et le Sacch. ellipsoideus II, moins de $5^1/_2$. Ici comme partout, ce sont seulement les points des courbes trouvés par une recherche directe qui ont servi à faire ces comparaisons.

Si toutes les séries d'expériences avaient été faites aux mêmes températures, on aurait sans doute pu établir d'autres comparaisons instructives de ce genre. Mais comme je me suis servi du grand thermostat de M. Panum (décrit dans le 1er vol. de ce Compte-Rendu, p. 27), cela n'était pas possible, et, sans cet appareil, je n'aurais pas été en état de terminer cette recherche dans un temps raisonnable; car, d'une part, le nombre des expériences était grand et la plupart, comme le montrent les tableaux, ont duré plusieurs jours — à la limite du minimum, elles ont même été poursuivies pendant 2 mois — et, de l'autre, j'ai opéré à un nombre assez notable de températures entre 0 et 38° C. Dans ces conditions, il ne pouvait donc guère être question de disposer un thermostat particulier pour chaque température, et, relativement à la détermination des courbes, cela n'a d'ailleurs aucune influence.

J'ai dit plus haut que la levûre employée dans les cultures des ascospores se composait toujours non seulement de cellules jeunes et vigoureuses, mais aussi de cellules engendrées dans les mêmes conditions. Comme on se rappelle, elle était d'abord cultivée dans du moût à la température d'un appartement, et, dans le produit de cette culture, on prenait ensuite quelques cellules jeunes pour les porter dans un nouveau moût de la même qualité que le premier (env. 14 % Ball.). On se servait toujours des ballons Pasteur à deux tubulures. Les dernières cultures se faisaient à c. 27° C. et duraient 1 jour environ. Tous ces détails ont leur importance. Les expériences ont en effet montré qu'il y a une différence sensible dans les résultats obtenus, suivant que la levûre, qui est ensemencée sur des blocs de plâtre, a été cultivée à 27° C. pendant 1 ou 2 jours. Dans les deux cas cependant, les cellules engendrées paraissent jeunes et vigoureuses et ont tout à fait le même aspect. Le tableau

suivant montre la marche que suit le développement des ascospores, lorsque la levûre du Sacch. Pastorianus I, employée dans les cultures sur le plâtre, a été cultivée pendant 2 jours à la température indiquée.

A 29° C. aucun développement d'ascospores.
- 28° C. apparition des premiers rudiments distincts au bout de 36 h.
- 27° C. . . . . 29 -
- 23° C. . . . . 30 -
- 15° C. . . . . 54 -

Si l'on compare ce tableau avec celui de la page 33, qui montre la marche du développement lorsque la levûre employée provient d'une culture poursuivie seulement pendant 1 jour à la température ci-dessus indiquée, la différence apparaît tout de suite. Chez les cellules cultivées pendant 2 jours, le développement des ascospores s'arrête déjà entre 28 et 29° C., tandis que les cellules dont la culture n'a duré que 1 jour en produisent encore à $29^1/_2$—$30^1/_2$° C. A 28° C., les cellules de la première catégorie demandent 36 heures, et celles de la seconde, seulement un peu plus de 24 heures pour développer des ascospores. Les premières n'ont en outre produit, à cette température, qu'un petit nombre de spores, tandis que les secondes en ont donné en abondance. C'est sans doute la proportion plus grande d'alcool due à la fermentation prolongée, qui affaiblit peu à peu la puissance de cette reproduction.

Ces observations donnent lieu de rechercher quelles sont les conditions les plus favorables au développement des ascospores. Il est probable que les différentes espèces ce comportent aussi différemment sous ce rapport. Mais cette recherche est un peu en dehors du plan de ce travail, et c'est pourquoi je la renverrai à plus tard.

Même en prenant les précautions mentionnées plus haut, et en veillant à ce que les expériences dont les résultats doivent être comparés se fassent exactement dans les mêmes conditions, il se produit cependant toujours de petites différences. J'ai donc eu soin de répéter plusieurs fois chaque série d'expériences, et les nombres indiqués sont les moyennes de 3—4 séries. Il est dans la nature des choses que des recherches physiologiques de cette espèce ne sauraient se faire avec l'exactitude uniforme d'une recherche purement chimique. On ne peut opérer avec un organisme vivant comme avec une matière privée de vie; car l'organisme signifie une infinité d'états divers qui peuvent chacun avoir une influence sur les résultats qu'on obtient. En d'autres termes, le même organisme, vis-à-vis des mêmes influences extérieures, peut se comporter différemment suivant l'état variable où il se trouve quand on le soumet à une expérience. Si nos recherches doivent réellement contribuer à faire découvrir des lois, il faut nous rappeler cela et chercher, au moins dans les traits principaux, à nous rendre bien compte de ce qu'elles peuvent nous donner. Aucun résultat, dans ce domaine, n'est pleinement valable dans tous les cas, mais seulement dans certaines limites, certaines conditions, non seulement en debors de l'organisme, mais aussi chez ce dernier lui-même, et c'est une chose essentielle que de les déterminer et de les indiquer aussi exactement que possible. Tout cela est en soi bien évident; cependant la plupart des travaux sur la physiologie des organismes

inférieurs dont il s'agit, se sont en général bornés à étudier l'influence des agents extérieurs, et ce n'est qu'exceptionnellement qu'on trouve des exemples d'auteurs qui ont tenu compte de l'état des organismes avec lesquels ils expérimentaient.

Les renseignements qui précèdent nous aident un peu à comprendre d'où viennent les erreurs et les opinions contradictoires qu'on rencontre si fréquemment dans les ouvrages qui traitent de la production des ascospores chez le genre Saccharomyces. M. Eidam a sans doute opéré avec de la levûre basse pure ou assez pure des brasseries; elle ne développe en général des ascospores que péniblement, et si en outre les cellules n'ont pas été jeunes ni vigoureuses, on comprend sans peine qu'il n'ait obtenu qu'un résultat négatif. Le froid nocturne ou un mode de culture mal choisi peut aussi avoir arrêté le développement. D'autres savants, qui ont obtenu un développement abondant et rapide, ont opéré avec des espèces comme le Sacch. cerevisiæ I ou avec des levûres spontanées, qui se prêtent à produire ces organes de fructification. Montrer comment, dans chaque cas, les erreurs ont pris naissance, serait le plus souvent chose impossible; cela n'a d'ailleurs pas grand intérêt.

J'ai mentionné, p. 16, que M. van Tieghem, dans un de ses mémoires, émet l'opinion singulière que la formation des ascospores est un développement pathologique dû à la présence des bactéries; mais il n'est pas difficile de ce convaincre que les choses ne se passent pas ainsi. Si, par ex., on établit avec grand soin des cultures sur des blocs de plâtre, on obtiendra en général une abondante production d'ascospores, sans que l'examen microscopique puisse faire découvrir une seule bactérie. Le résultat est le même si l'on fait l'expérience avec les lames de verre à la gélatine décrites p. 31.

Cependant, pour décider avec une pleine certitude si des cellules de levûre pures de tout mélange avec des bactéries peuvent ou non développer des ascospores, j'ai fait les expériences suivantes: un ballon Pasteur, de $^1/_8$ de litre, qui contenait un mélange stérilisé composé de moût de bière et de gélatine, fut, pendant le refroidissement, incliné de manière que la gélatine, en se solidifiant, formât une pellicule sur une grande partie de ses parois, et mis ensuite en communication avec un second ballon où se trouvait une culture à l'état de pureté de cellules jeunes et vigoureuses de Sacch. ellipsoideus I, après quoi quelques-unes de ces cellules y furent introduites avec un peu d'eau stérilisée et, à l'aide de quelques secousses, répandues en une couche mince sur la gélatine. La plus grande partie de l'eau se rassemblait au fond du ballon, au-dessous des cellules de levûre, et servait à y entretenir l'humidité nécessaire. Après avoir préparé plusieurs de ces ballons, je les exposai dans un thermostat, les uns à la température de 25^0 C., les autres à 17^0 C., et, au bout de peu de temps, ils renfermaient tous des cellules avec des ascospores, mais sans qu'il fût possible d'y découvrir une seule bactérie, même après qu'ils étaient restés longtemps dans le thermostat, et cependant les

conditions étaient très favorables. Il va sans dire que je prenais toujours les précautions nécessaires pour me mettre à l'abri des microorganismes étrangers. Une autre expérience faite avec le Sacch. Pastorianus I ou II — mes notes n'indiquent pas lequel — m'a donné le même résultat. La levûre fut versée avec de l'eau de levûre stérilisée dans un des ballons ci-dessus mentionnés et le mélange, fortement aéré pendant quelque temps avec de l'air débarrassé de tout organisme. Les cellules produisirent successivement des ascospores en assez grande abondance, mais je ne trouvai pas trace de bactéries; la température, 24° C., et le liquide nourricier étaient cependant très favorables au développement des bactéries, et elles se seraient aussi montrées s'il y en avait eu. Toutes ces expériences démontrent clairement que l'interprétation du botaniste français est inexacte.

Les ascospores résistent mieux que les jeunes cellules végétatives à un chauffage dans l'eau. Cela résulte des expériences suivantes.

Après avoir cultivé pendant quelque temps le Sacch. ellipsoideus II dans du moût de bière à la température ordinaire d'un appartement, et ensemencé des cellules jeunes et vigoureuses provenant de cette culture dans un moût semblable au premier, j'exposai ces dernières pendant 2 jours à une température de 27° C., et plongeai une partie des cellules de levûre produites dans cette nouvelle culture dans de l'eau distillée stérilisée chauffée à 54° C. Elles étaient encore vivantes après y avoir séjourné 5 minutes; mais, dans les mêmes circonstances, elles n'ont pu supporter de rester 5 minutes dans de l'eau chauffée à 56° C.

Des ascospores complètement mûres, développées à 17—18° C., et en partie séchées pendant 8 jours à cette température sur des blocs de plâtre, ont, dans les mêmes conditions, résisté à un séjour de 5 minutes dans de l'eau à 62° C., mais non à un séjour de même durée dans de l'eau portée à 66° C.

J'ai fait des expériences analogues avec le Sacch. cerevisiæ I; elles montrent que les cellules végétatives, cultivées de la même manière que celles de l'espèce précédente, ne peuvent supporter pendant 5 minutes qu'une température de 52° C.; au bout de ce temps, dans de l'eau chauffée à 54° C., elles étaient mortes.

Les ascospores de cette espèce, traitées de la même manière que les précédentes, sont restées vivantes après avoir séjourné 5 minutes dans de l'eau à 58° C., mais non après le même temps dans de l'eau à 62° C.

Ces expériences ne nous apprennent pas seulement que les spores complètement mûres supportent dans l'eau une température plus élevée que les jeunes cellules végétatives, mais prouvent en même temps que la résistance à la chaleur et des spores et des cellules végétatives varie suivant les espèces. Qu'il y ait aussi des espèces qui se comportent de la même manière sous ce rapport, j'ai tout lieu de le supposer.

De même que dans les expériences sur le développement des ascospores, l'état des cellules avec lesquelles on opère a également ici une grande influence. Le résultat est, par ex., très différent suivant qu'on s'est servi de vieilles ou de jeunes cellules. J'en ai eu un frappant exemple dans mes recherches sur le Sacch. ellipsoideus II. Comme comparaison avec les expériences ci-dessus décrites, faites avec de jeunes cellules d'une culture datant seulement de 2 jours, j'en ai exécuté une parallèle avec des cellules d'une culture semblable, mais vieille de $2^1/_2$ mois. Ces cellules ont résisté à un séjour de 5 minutes dans de l'eau chauffée à 60^0 C., et il n'est même pas probable que la limite mortelle ait été atteinte. Dans la levûre de dépôt, on a trouvé de nombreuses cellules de la „levûre aérobie“ fortement développée à la surface de la bière. Je n'ai pas encore recherché si ce sont ces dernières cellules ou celles de la levûre de dépôt qui ont supporté cette haute température. Mais ces expériences se poursuivent au laboratoire, et j'espère pouvoir, en son temps, donner des renseignements plus précis tant sur cette question que sur d'autres qui s'y rattachent.

La température exerce également sur le bourgeonnement une influence variable suivant les espèces. Les recherches que j'ai faites jusqu'ici sur cette question m'ont principalement montré que les températures maxima des espèces ne sont pas les mêmes. On pourra donc, par cette voie, trouver aussi des caractères. On en obtiendra également par une étude attentive des transformations chimiques que les Saccharomyces, dans les mêmes conditions, peuvent provoquer dans un liquide nourricier. C'est ce que j'ai constaté dans mes recherches sur le Sacch. apiculatus, et des observations dans ce sens relatives à d'autres espèces se trouvent tant chez M. Pasteur que dans mes précédents mémoires et dans celui qu'on trouvera plus loin sur des maladies de la bière.

Pour terminer ce sujet, je mentionnerai encore un intéressant exemple de l'action de la température sur les cellules du Sacch. cerevisiæ (levûre basse des brasseries).

Dans ses „Études sur la bière“, p. 191, M. Pasteur dit de cette levûre qu'après avoir été laissée des mois entiers dans de l'eau sucrée, ou dans la bière qu'elle a formée par sa fermentation, elle ne tend pas, comme le Sacch. Pastorianus, à produire des cellules allongées lorsqu'on la cultive dans un bon liquide nourricier, par ex. du moût aéré, mais qu'elle développe au contraire des cellules de forme normale. Cela n'est pas tout à fait exact. Le résultat est en effet tout différent suivant que la nouvelle culture dans le moût se fait à une température élevée ou à une basse température. C'est ce que prouve l'expérience suivante.

Après avoir cultivé, pendant une année, des cellules de Sacch. cerevisiæ (levûre basse des brasseries) dans une dissolution de saccharose, qui était souvent renouvelée dans les premiers temps, je semai une petite portion de cette levûre épuisée dans deux ballons avec du moût, qui furent ensuite exposés dans le thermostat, l'un à 27^0 C. et l'autre à $7^1/_2{}^0$ C. Deux jours s'étaient à peine écoulés que la fermentation se déclarait dans le premier. L'examen microscopique fit

voir que les cellules nouvelles avaient pour la plupart la forme normale; elles étaient en effet le plus souvent ovales, rarement en forme de boudin, et se montraient soit isolées soit en petites colonies. Quant au ballon qui avant été exposé à une basse température, il ne montra des signes de fermentation qu'au bout de 14 jours, et les cellules nouvelles avaient un aspect tout à fait insolite; leur pouvoir réfringent était plus faible que d'ordinaire et, relativement à la forme, elles avaient subi une transformation très frappante. En effet, les cellules allongées étaient maintenant nombreuses, et il n'était pas rare qu'elles formassent des colonies ramifiées et enchevêtrées, ressemblant à du mycélium. En un mot, elles ne répondaient plus du tout à l'image qu'on se fait en général du Sacch. cerevisiæ, mais ressemblaient complètement aux dessins que M. Pasteur a donnés du Sacch. Pastorianus dans son livre précité, par ex. Fig. 33, 34, 36 et 37, p. 171—175. Une expérience analogue faite avec de la levûre de dépôt qui avait séjourné quelques mois dans de la bière m'a donné le même résultat. Dans les deux cas, j'ai opéré avec des cultures parfaitement pures. La vieille levûre épuisée cultivée dans du moût, a ainsi développé à $7^1/_2{}^0$ C. une végétation dont les cellules avaient un tout autre aspect que celles qui s'étaient formées à 27^0 C.

Récapitulation.

Dans la première partie de ce mémoire, nous avons fait une étude détaillée de la littérature concernant les ascospores chez le genre Saccharomyces. Nous nous proposons d'en récapituler ici en peu de mots les points principaux, en y joignant un résumé des recherches nouvelles qui font l'objet de ce mémoire.

Relativement a la communication de M. Engel sur un développement particulier de spores chez le Sacch. apiculatus, nous avons constaté qu'elle repose sur une erreur et que son nouveau genre, Carpozyma, ne peut par conséquent être reconnu. Les recherches de M. Brefeld sur les rapports entre la levûre de l'industrie et la levûre spontanée sont, nous l'avons vu, manquées, et la théorie qu'il a fondée là-dessus n'est par suite pas soutenable. Il en est de même de la nouvelle interprétation que M. van Tieghem a donnée des ascospores. La nouvelle méthode technique de M. Wiesner s'est également montrée inexacte.

Le résultat certain des travaux que nous avons examinés est dû principalement à M. Reess et se borne à ce renseignement, que des espèces du genre Saccharomyces, dans certaines conditions encore superficiellement connues, peuvent produire des cellules endogènes, et que celles-ci, cultivées dans un liquide nourricier convenable, se développent en cellules végétatives bourgeonnantes. Le mémoire de M. Engel nous a enseigné une méthode perfectionnée pour entreprendre des cultures d'ascospores.

En examinant les méthodes que M. Pasteur, dans son célèbre ouvrage sur la bière et ses maladies, a employées pour l'étude des

espèces du genre Saccharomyces, nous sommes arrivé à reconnaître qu'elles sont insuffisantes et que, par la voie qu'il a suivie, on ne peut sortir du vague et de l'incertain. Relativement à l'importante question des cultures à l'état de pureté, nous avons vu que, tandis qu'il en a résolu un des côtés avec un rare degré de perfection, il n'a, en revanche, fait que peu de chose pour l'autre. Il nous a donné d'excellentes indications pour préserver les cultures de l'invasion de tout organisme étranger pendant la durée des expériences, mais les méthodes qu'il emploie pour obtenir des cultures de Saccharomyces à l'état de pureté sont défectueuses, et ne peuvent, dans la plupart des cas, conduire au but. Telle est la cause du manque de clarté et des défauts par lesquels pèche, sous quelques rapports, son traitement des levûres alcooliques.

Nous avons constaté que ni la forme, ni les dimensions, ni l'aspect, ni les ascospores des cellules des Saccharomyces ne sont par eux-mêmes suffisants pour fournir des caractères spécifiques, et qu'il est possible, en employant un traitement convenable, de faire développer par une des espèces des formes qui peuvent être rapportées à toutes les species à ascospores citées par M. Reess. Pour le moment, c'est encore une question non résolue si les formes qui y appartiennent constituent une ou plusieurs species. Ce système ne nous donne donc pas non plus de guide sûr.

Les recherches devaient par conséquent être reprises à de nouveaux points de vue, et le problème à résoudre, devenir celui-ci: d'abord perfectionner la méthode de manière à pouvoir obtenir des cultures provenant chacune d'une seule cellule, ensuite rechercher si ces cultures présentent des caractères constants et, dans ce cas, les déterminer.

Il est évident qu'en diluant suffisamment un liquide qui renferme des cellules d'un microorganisme, il arrivera un moment où une certaine mesure du mélange dilué, en y supposant les cellules uniformément réparties, ne renfermera qu'une seule cellule.

La plupart des cultures à l'état de pureté employées dans les expériences qui précèdent ont été préparées en introduisant une petite portion de levûre dans une quantité d'eau pesée à l'avance. Le nombre des cellules était ensuite déterminé à l'aide de l'hématimètre, après quoi on diluait le mélange de manière qu'il ne renfermât définitivement qu'un très petit nombre de cellules, par ex. une demi cellule par centimètre cube. En en versant alors 1 c. c. dans chacun d'un certain nombre de ballons qui renfermaient du moût de bière, il y avait une certaine probabilité que quelques-uns d'entre eux recevraient chacun une cellule.

Dans la deuxième partie, où la portée de la méthode a été examinée, nous avons toutefois trouvé qu'elle n'était pas toujours d'accord avec le calcul. L'eau servant à l'ensemencement ne renfermait, par ex. quelquefois, aucune cellule, et d'autres fois, au contraire, elle en contenait plus que le calcul n'avait indiqué. On évite cet inconvénient en employant ma lame de verre décrite p. 24.

Comme il a été dit plus haut, nous avons seulement une certaine probabilité que quelques-uns de nos ballons ensemencés ont reçu

chacun une cellule. Il s'agissait donc de trouver un caractère qui permît de distinguer ces ballons des autres. Ce caractère important nous a été fourni par le nombre des taches de levûre qui se forment sur les parois des ballons (voir p. 25).

Nous avons obtenu un autre contrôle en mélangeant dans un de nos ballons avec de l'eau deux espèces connues (le Sacch. apiculatus et le Sacch. cerevisiæ) qui, par leur forme, peuvent facilement être distinguées l'une de l'autre. L'expérience terminée, elles étaient de nouveau séparées et on les a trouvées, chacune à part, dans ceux des ballons renfermant un liquide nourricier qui avaient été ensemencés, preuve évidente de la bonté de la méthode.

On a également employé la méthode exposée notamment par M. Koch pour préparer à l'état de pureté des cultures de microorganismes, et elle a, comme les autres, été soumise à une épreuve expérimentale à l'aide de la levûre caractéristique, en forme de citron, du Sacch. apiculatus. Nous avons reconnu par là que les taches qui se développaient renfermaient bien en général une seule espèce, mais que ce n'était nullement toujours le cas. Il restait donc à chercher comment on pourrait éviter ces exceptions. Il se présente ici deux moyens. On peut répéter l'expérience avec des cellules d'une des taches développées, et si, la première fois, on n'a pas obtenu un ensemencement d'une seule cellule, il est probable qu'on sera plus heureux la seconde. Mais, comme nous l'avons vu, le but ne sera pleinement atteint que si l'on entreprend la culture dans une chambre humide, et y observe le développement provoqué par une seule cellule.

Dans des recherches qui, comme celles-ci, s'étendent sur un espace de plusieurs années, il importe de trouver des moyens de conservation commodes, à l'aide desquels les cellules puissent être maintenues longtemps vivantes et à l'abri de toute infection. J'ai obtenu ce résultat au moyen du liquide décrit p. 29 et du séchage avec du papier brouillard, p. 29.

Le présent mémoire comprend principalement une série de recherches sur la formation des ascospores. Pour les cultures qui s'y rapportent, on a ordinairement employé les blocs de plâtre de M. Engel. Nous avons vu aussi que les lames de verre porte-objet, recouvertes d'une couche de gélatine, offrent un moyen commode de faire ces cultures lorsque la température à laquelle on opère n'est pas trop élevée, et enfin qu'on peut également provoquer ce développement dans l'eau de levûre aérée.

Les figures, sur la planche III ci-jointe, nous montrent des exemples des formes particulières de développement que nous avons appelées formations cloisonnées. On y a également représenté des cellules qui renferment des ascospores en nombre plus grand que le chiffre normal, savoir 5—10. Comme on l'a vu, ce sont surtout les espèces du groupe Pastorianus qui, sous ce dernier rapport, ont de la tendance à sortir de la règle. Du reste, ces figures nous apprennent de nouveau que les mêmes groupements et les mêmes dimensions peuvent se retrouver chez toutes les espèces examinées, et qu'on ne saurait par cette voie obtenir des caractères spécifiques.

Nous avons alors posé autrement la question, en recherchant l'influence de la température sur la marche du développement, et cette étude nous a fourni des précieux renseignements.

Elle nous a montré qu'aucune de nos six espèces, dans les conditions données des cultures, ne développait des ascospores à une température plus basse qu'entre $^1/_2$ et 3^0 C., et que la température la plus élevée à laquelle elles se produisaient est voisine de $37^1/_2{}^0$ C. Les courbes des températures ont, dans les six cas, une forme analogue. A partir des ordonnées correspondant aux températures les plus basses, elles descendent vers l'axe des abscisses et remontent ensuite un peu. Mais les points déterminés par les températures maxima et minima fournissent de bons caractères distinctifs des espèces.

Il est probable qu'une recherche comparative analogue pourrait également apporter quelques éclaircisssements sur le groupe des bactéries. Ma première communication de 1882 a déjà attiré sur ce point l'attention de quelques savants, mais il n'a pas encore été publié de recherches à ce sujet. Peut-être qu'une pareille recherche rencontrera des difficultés plus grandes que celles que j'ai eu à surmonter.

En considérant le temps que les six espèces demandent, à température égale, pour développer des ascospores, nous avons trouvé qu'il y a également des différences sous ce rapport, comme le montre, par ex., notre expérience comparative à $11^1/_2{}^0$ C.

Nous avons fait observer que, dans les recherches de ce genre, il ne suffit pas de tenir compte seulement de l'influence des agents extérieurs, mais qu'il faut en même temps veiller à ce que les cellules des espèces avec lesquelles on expérimente soient engendrées dans les mêmes conditions.

Nous avons vu aussi que, dans d'autres cas, il y a une différence dans la manière dont les espèces réagissent contre la température.

Le Sacch. ellipsoideus II supporte ainsi dans l'eau une température plus élevée que le Sacch. cerevisiæ I., aussi bien lorsqu'on opère avec les spores de ces deux espèces qu'avec leurs jeunes cellules végétatives. Les ascospores mûres de la même espèce résistent mieux à la chaleur que les toutes jeunes cellules végétatives.

Relativement au bourgeonnement, nous avons également constaté que la température exerce une influence différente sur les diverses espèces.

Les expériences décrites en dernier lieu montrent enfin, par un intéressant exemple, comment la température, dans certains cas, peut déterminer la forme de la cellule.

Nos expériences se sont ainsi étendues à des questions connexes, et par là le contenu de ce mémoire est, à proprement parler, devenu une contribution à une recherche générale sur l'influence que la température exerce sur les Saccharomyces dans les conditions différentes où ils se trouvent placés, mais toujours spécialement au point de vue de la question principale, posée dès l'origine, des espèces et de leur délimitation.

Explication des Planches.

Les deux Planches avec des courbes.

Ces courbes ont pour abscisses les températures et pour ordonnées les espaces de temps que le développement des ascospores exige pour se produire à ces températures.

Planche I.

Saccharomyces cerevisiæ I. p. 33 et 37—38.
Saccharomyces Pastorianus I. p. 33 et 37—39.
Saccharomyces Pastorianus II. p. 34 et 37—38.

Planche II.

Saccharomyces Pastorianus III. p. 34 et 37—38.
Saccharomyces ellipsoideus I. p. 35 et 37—38.
Saccharomyces ellipsoideus II. p. 35 et 37—38.

Planche III.

Le grossissement lin. de toutes les figures est de 1000 fois env. *a*, cellules avec des formations cloisonnées; *b*, cellules qui renferment des ascospores en nombre plus grand que le chiffre normal; *c*, cellules avec des rudiments distincts d'ascospores; c'est cette phase du développement qui a été employée pour déterminer le temps que ces organes demandent pour se former aux différentes températures.

Fig. 1. Saccharomyces cerevisiæ I. p. 32.
— 2. Saccharomyces Pastorianus I. p. 33.
— 3. Saccharomyces Pastorianus II. p. 34.
— 4. Sacccharomyces Pastorianus III. p. 34.
— 5. Saccharomyces ellipsoideus I. p. 35.
— 6. Saccharomyces ellipsoideus II. p. 35.

III.

Sur les Torulas de M. Pasteur.

Lorsqu'on poursuit pendant longtemps des recherches étendues sur les Saccharomyces, on ne peut éviter de rencontrer souvent les cellules ressemblant à des levûres que M. Pasteur, dans son livre sur la bière et ses maladies, a appelées Torulas; elles sont très répandues et appartiennent, comme nous le verrons, à plusieurs espèces. Pour obtenir quelque certitude dans ce domaine, il est nécessaire, au moins dans une certaine mesure, de soumettre ces cellules à une étude approfondie. Dans le 1^er^ vol. 4^e^ liv. de ce Compte-rendu, j'ai publié quelques renseignements à ce sujet; mais, depuis lors, j'ai augmenté le nombre de mes observations et ajouté de nouvelles contributions aux résultats communiqués par M. Pasteur, et, comme je ne reprendrai pas de sitôt ces recherches, je me propose aujourd'hui

de donner un exposé de ce que nous savons pour le moment sur ces formes.

Sur la Pl. III de l'ouvrage cité, M. Pasteur a représenté deux formes de son Torula, une assez grande et une petite, mais toutes les deux sphériques, et dans sa Fig. 12, p. 75, nous retrouvons en partie les mêmes, en partie des colonies de cellules allongées et en forme de boudin en train de bourgeonner. Toutes ces figures ont une grande ressemblance avec les Saccharomyces, et les cellules allongées peuvent en même temps, par leur forme, être rapportées au Dematium ou à des moisissures analogues. De ce que les Torulas ne produisent qu'une très petite quantité d'alcool, même après avoir séjourné longtemps dans un liquide nourricier fermentescible, M. Pasteur conclut qu'ils n'appartiennent pas aux espèces proprement dites du genre Saccharomyces. Il est enclin à croire qu'ils doivent être rapportés au Sacch. Mycoderma (Mycoderma vini).

J'ai observé 5 espèces différentes de petites cellules rondes, ressemblant à des levûres, comme celles que M. Pasteur a représentées sur sa Pl. III.



Fig. 1.

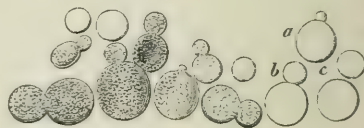


Fig. 2.

La Fig. 1 en représente une. Si l'on cultive ces cellules dans du moût de bière, elles y vivent ou isolées ou réunies en petites colonies. Dans ce dernier cas, elles forment souvent des chaînes de 3—4 cellules. Lorsqu'elles ont des vacuoles, on en trouve ordinairement une grande au centre de la cellule, et y observe quelquefois un petit grain très réfringent. Les cellules mesuraient $1^1/_2$—$4^1/_2$ micromillim.

La Fig. 1 *a* montre quelques cellules qui commencent à bourgeonner, et en *b* on voit les mêmes cellules à peine 1 heure plus tard. Elles ont été cultivées dans du moût de bière, dans la chambre de Ranvier, à la température ordinaire d'un appartement. Après un très long séjour dans du moût, et dans des dissolutions de sucre, elles n'ont produit qu'une quantité à peine sensible d'alcool, sans la moindre trace d'écume. Elles ne séparent pas l'invertine.

Dans la Fig. 2, est représentée une espèce dont les cellules, lorsqu'on les cultive dans les mêmes conditions que les précédentes, deviennent plus grandes que ces dernières; elles mesuraient en effet 3—8 micromillim. Dans les cultures au moût, leur protoplasme devenait souvent grumeleux et renfermait de petits grains fortement réfringents. Du reste elles se comportaient comme l'espèce précédente.

La Fig. 2 *a* représente une cellule qui a poussé un petit bourgeon; en *b* et en *c*, on voit la même cellule respectivement $1^1/_2$ et $3^1/_2$ heures plus tard. L'expérience a été faite dans la chambre de Ranvier de la même manière que pour l'espèce précédente.

Une troisième espèce qui, quant à l'aspect et à la grandeur, ressemble beaucoup à celle de la Fig. 2, a, dans des cultures semblables dans du moût (14 $^0/_0$ Ball.), donné jusqu'à $^7/_8$ de vol. $^0/_0$ d'alcool; à la surface du liquide en fermentation, on a observé dans ce cas une formation faible mais distincte d'écume, et les analyses ont démontré qu'il s'était dégagé de l'acide carbonique. Après avoir séjourné 16 jours, à la température ordinaire d'un appartement, dans une dissolution de saccharose, elle ne l'avait pas encore intervertie.

La forme représentée Fig. 3 était, au point de vue de la grandeur, intermédiaire entre celles décrites plus haut; ses cellules mesuraient en effet 2—6 micromillim. Au point de vue physiologique, elle se distinguait essentiellement des précédentes, car elle intervertissait la saccharose et provoquait dans le moût (14 $^0/_0$ Ball.) et les dissolutions de sucre une fermentation assez énergique (un peu plus de 1 vol. $^0/_0$), avec formation de beaucoup d'écume.

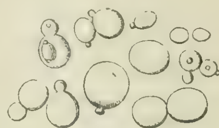


Fig. 3.

Les 4 espèces ci-dessus décrites ont cela de commun que, cultivées sur des blocs humides de plâtre, des tranches de pommes de terre et des couches de gélatine avec différents liquides nourriciers, elles ne développent ni ascospores ni mycélium, mais, comme dans les liquides sucrés, ne se multiplient que par bourgeonnement.

Dans aucun des liquides employés pour les cultures (moût, bière, eau de levûre, dissolutions de dextrose et de saccharose), elles n'ont formé de membranes comme le Sacch. Mycoderma.

Au bout de quelques mois, il se forme dans les cultures au moût des membranes analogues à celles qui sont ordinaires chez les espèces du genre Saccharomyces („levûre aérobie“ de M. Pasteur). Mais elles sont d'une tout autre nature que les membranes du Mycoderma et il ne faut pas les confondre. Dans les formations des „levûres aérobies“, les cellules de notre troisième espèce étaient souvent allongées; celles des autres espèces avaient au contraire l'aspect ordinaire.

Lorsque les espèces ci-dessus décrites, après avoir été longtemps soumises dans la saccharose à un régime débilitant, étaient semées dans du moût, elles s'y multipliaient comme d'habitude par bourgeonnement, et les cellules nouvelles étaient sphériques comme auparavant, sans manifester aucune tendance à prendre une forme allongée, ce qui est au contraire ordinaire chez certaines espèces de Saccharomyces.

Que, parmi ces formes, que M. Pasteur a appelées Torulas, il s'en trouve réellement qui produisent des membranes et qui, par conséquent, ressemblent sous ce rapport au Sacch. Mycoderma, c'est ce que j'ai souvent eu l'occasion d'observer dans le cours de la dernière année. L'une d'elles, que j'ai spécialement examinée, ressemblait surtout à la Fig. 1. Semée dans du moût, de l'eau de levûre, de la

bière de garde ou même dans des liquides nourriciers fortement alcooliques (10 vol. $^0/_0$), elle développait rapidement, à la température ordinaire d'un appartement, une membrane unie, terne, grisâtre, qui s'étendait sur toute la surface du liquide. Sur les dissolutions de saccharose, elle ne formait qu'une membrane faiblement développée, et elle intervertissait ce liquide.

Après avoir été cultivée plusieurs mois dans la saccharose, elle fut semée dans du moût, où elle produisit aussi de vigoureuses végétations, mais seulement formées de cellules rondes. Elle ne provoqua pas de fermentation sensible et, même après une très longue culture dans le moût, on eut de la difficulté à y découvrir de faibles traces d'alcool.

Dans les cultures sur des blocs de plâtre, des tranches de pommes de terre et de la gélatine nutritive, elle n'a développé ni ascospores ni mycélium. Elle a conservé, en un mot, sa forme ronde dans tous les modes de culture.

Il va sans dire que les expériences ci-dessus mentionnées ont été faites avec des cultures à l'état de pureté, et que les liquides employés étaient stérilisés. Les figures montrent toutes les cellules dont il s'agit avec un grossissement linéaire de 1000 fois.

Malgré les différences physiologiques que présentent ces cinq espèces, il n'est pas possible, à l'aide du microscope seul, de les distinguer les unes des autres. Elles sont incolores aussi bien à la lumière réfléchie que transmise, et, vis-à-vis des réactifs microchimiques, elles se comportent identiquement et de la même manière que les espèces du genre Saccharomyces qui ont été examinées sous ce rapport.

Comme il a été dit plus haut, ces cellules de Torulas sont très répandues. Dans les recherches que j'ai faites, pendant les années 1878—1881, sur les microorganismes de l'air à Carlsberg et aux alentours, elles ont été fréquemment observées aussi bien dans l'intérieur des bâtiments qu'à l'air libre. Je les ai souvent trouvées dans des fleurs et sur d'autres organes végétaux, de même aussi que sur des raisins mûrs, dans les Vosges, pendant les vendanges de 1881, et dans la terre des jardin et des champs. On les rencontre très ordinairement dans les poils des abeilles et des bourdons hivernés et dans les demeures de ces insectes.

Par suite de leur grande ressemblance extérieure avec des cellules rondes des espèces du genre Saccharomyces, elles peuvent facilement être confondues avec ces dernières. De pareilles erreurs ont aussi souvent été commises. Il est surtout facile de se tromper avec des formes telles que la quatrième dans notre description précédente, qui ont une puissance fermentative assez développée.

Le seul caractère que nous puissions, pour le moment, établir ici est la formation des ascospores. On ne le trouve pas chez nos cellules de Torulas, et c'est pourquoi nous ne les rangeons pas dans le genre Saccharomyces. Les Torulas étudiés par M. Pasteur ne produisaient, on se le rappelle, aucune fermentation alcoolique ou n'en donnaient tout au plus qu'une extrêmement faible, et il en a conclu qu'ils ne pouvaient être rapportés au dit genre. Mais nous avons vu dans ce qui précède que, parmi ses Torulas, il y a une

série de formes douées d'un pouvoir fermentatif plus ou moins développé, et qui constituent toute une échelle, à partir du point où il n'est pas possible d'observer avec certitude quelque fermentation alcoolique jusqu'à celui où elle se manifeste avec assez d'énergie. Par cette voie, on ne peut donc trouver aucune limite. En établissant la formation des ascospores comme caractère distinctif, il ne faut pas oublier que, parmi les espèces qui sont en général rapportées au genre Saccharomyces, il s'en trouve une, le Sacch. Mycoderma, dont on ne sait pas au juste si elle peut ou non développer des ascospores, et une autre, le Sacch. apiculatus, chez laquelle il a été maintenant constaté que ces organes ne se développent pas, du moins dans les mêmes conditions que chez les espèces examinées jusqu'ici. Mais, pour le moment, une réforme de la classification et une introduction de nouveaux noms seraient prématurées; il faut attendre pour cela que toutes les recherches nécessaires aient été exécutées.

Dans les cultures nombreuses et variées que j'ai faites avec les cinq espèces décrites plus haut, il ne s'est jamais produit aucun signe qui indiquât, comme M. Pasteur est disposé à le croire, qu'elles seraient des formes du Sacch. Mycoderma. Il est aussi plus vraisemblable qu'elles sont des états de développement d'autres champignons. Il y a en effet beaucoup d'exemples que des champignons appartenant à différents groupes systématiques peuvent développer des cellules ressemblant à des Saccharomyces; M. de Bary l'a constaté, par exemple, chez le Dematium pullulans et l'Exoascus Pruni et M. Zopf, chez le Fumago. Cela n'exclut pas toutefois la possibilité qu'elles soient des espèces distinctes qui ne revêtent pas d'autres formes que celles décrites par M. Pasteur et par moi.

Parmi les cellules que M. Pasteur a représentées dans la Fig. 12, il s'en trouve quelques-unes qui rappellent en partie le Sacch. Mycoderma, en partie son „Dematium levûre". Il n'est pas invraisemblable que nous avons affaire ici avec les mêmes formes dont j'ai parlé dans ce Compte-rendu, 1^er^ vol. 4^e^ liv. p. 214. Ce sont des cellules plus ou moins allongées, ramifiées, incolores, qui ressemblent à certains états de développement du Dematium pullulans. Celles que j'ai examinées dans le temps ne produisaient aucune fermentation alcoolique ou n'en donnaient qu'une très faible; mais elles intervertissaient rapidement les dissolutions de saccharose.

Quant au nom même de Torula, il a la fâcheuse qualité de ne plus répondre à aucune signification déterminée, car, dans le cours des temps, il a été employé pour désigner une foule de microorganismes supérieurs et inférieurs qui diffèrent beaucoup entre eux.

Le résultat principal de ces recherches est qu'il existe dans la nature plusieurs espèces très répandues de cellules ressemblant à des Saccharomyces, dont nous connaissons, sous quelques rapports, les caractères physiologiques, mais dont nous ne savons que fort peu de chose relativement à la place qu'elles occupent dans le système. En comparaison avec les espèces du genre Saccharomyces dont l'action est la plus énergique, les formes examinées jusqu'ici par M. Pasteur et par moi ne produisent qu'une faible fermentation alcoolique (fermentation basse), et quelques-unes ne possèdent certainement pas du tout cette

faculté. Les unes intervertissent les dissolutions de saccharose et les autres, non. Parmi ces formes, il y en a au moins une qui, en opposition avec les autres décrites par moi, produit rapidement des membranes à la surface des liquides nourriciers sur lesquels elle est semée, que ces liquides renferment ou non de l'alcool.

IV.

Maladies provoquées dans la bière par des ferments alcooliques.

Parmi les maladies que les ferments alcooliques peuvent provoquer dans la bière, il y en a une qui, dans les dernières années, a attiré tout particulièrement l'attention aussi bien en Danemark que notamment en Allemagne. Elle a occasionné de grandes pertes dans beaucoup de brasseries et, malgré tout ce qui a été écrit à ce sujet, elle reste toujours encore une énigme menaçante. Je veux parler de la maladie qui est connue sous le nom de trouble de la levûre. Après que la bière basse est restée le temps voulu dans les caves de garde et qu'on a procédé au soutirage, elle est parfaitement claire et il est impossible, à l'œil nu, d'y découvrir de la levûre, mais dès que les fûts ou les bouteilles où elle a été soutirée ont été exposés pendant quelques jours à une température plus élevée que celle des caves de garde, par ex. à la température ordinaire d'un appartement, il s'y forme un précipité plus ou moins abondant de levûre, et il suffit d'une légère secousse pour qu'elle se répande dans le liquide et le rende trouble. Il y a plusieurs degrés dans cette maladie; est-elle très développée, la bière qui en est attaquée est déjà fortement chargée de levûre 1—2 jours après le soutirage, et cesse d'être potable; l'est-elle moins, la bière peut se conserver plusieurs jours, surtout si la température n'est pas trop élevée, mais jamais aussi longtemps que la bière saine.

Comme nous l'avons dit plus haut, cette question si importante pour l'industrie des fermentations a donné lieu à de nombreuses publications. Elle a été traitée dans tous les ouvrages récents sur la fabrication de la bière et discutée dans des mémoires qui ont paru dans des revues spéciales. On y a comparé les observations recueillies dans la pratique et émis des hypothèses sur la cause du mal. Quelques auteurs pensent que c'est une levûre étrangère, le Sacch. exiguus, qui provoque la maladie; d'autres supposent au contraire qu'elle est causée par une dégénération de la levûre ordinaire même des brasseries, le Sacch. cerevisiæ, qui, par suite, au lieu de développer des cellules grandes et lourdes, n'en donne que de petites et de légères.

Cette littérature, qui est l'expression des idées que des praticiens réfléchis se sont formées du phénomène, renferme de bons avis qui méritent d'être médités. Toutefois, il est évident que la question ne peut être résolue par une discussion basée sur des observations éparses, mais seulement par une recherche expérimentale conduite

avec méthode. C'est une recherche de ce genre qui est publiée ici pour la première fois.

Il y a quelques années, une des grandes brasseries de Copenhague eut le malheur de voir la maladie dont il s'agit se glisser dans son exploitation. Elle y sévit assez longtemps et causa beaucoup de dommage. C'est seulement après avoir arrêté la fabrication, et fait nettoyer à fond, peindre et vernisser aussi bien les locaux que les cuves et tout l'outillage, qu'on réussit à se rendre maître du mal, et quand l'exploitation fut reprise avec de la bonne levûre d'un autre établissement, la bière put de nouveau se conserver comme auparavant. Voulant essayer d'éclaircir, si c'était possible, ce qu'il y avait d'obscur dans cette affaire, je m'adressai au directeur de la brasserie pendant que la maladie était encore à son point culminant, en le priant de me laisser prendre de temps à autre des échantillons de la bière dans ses différents états. Ces échantillons et les renseignements que je désirais me furent communiqués avec la plus grande obligeance, et je lui en exprime ici mes remercîments.

A l'aide des méthodes exposées dans un de mes précédents mémoires, j'isolai les microorganismes qui se trouvaient dans la bière malade. J'obtins ainsi trois espèces de ferments alcooliques: le Sacch. cerevisiæ (levûre basse qui constituait la partie principale de la levûre de la dite brasserie), le Sacch. Pastorianus III (une forme de levûre haute p. 34) et le Sacch. ellipsoideus II (une forme de levûre basse p. 35).

Je cherchai ensuite à constater si la maladie était due à l'une des deux dernières levûres. Dans ce but, je disposai d'abord une série d'expériences avec 6 ballons Pasteur contenant chacun 700 cent. cub. du même moût stérilisé, et dont deux étaient marqués *A*, deux, *B* et deux, *C*. Dans chacun des deux ballons marqués *A*, je semai 1,25 c. c. de Sacch. cerevisiæ, dans chacun des deux ballons marqués *B*, 1 c. c. de la même levûre plus 0,25 c. c. de Sacch. ellipsoideus II, et dans chacun des deux ballons marqués *C*, 1 c. c. du même Sacch. cerevisiæ plus 0,25 c. c. de Sacch. Pastorianus III. La levûre employée était dans tous les cas assez épaisse et à peu près identique sous ce rapport; elle provenait de cultures à l'état de pureté faites dans les mêmes conditions et se composait de cellules jeunes et vigoureuses.

La fermentation principale, basse dans *A* et *B* et avec de faibles phénomènes de fermentation haute dans *C*, eut lieu à la température ordinaire d'un appartement, et la fermentation ultérieure, à 7° C., dans des ballons Pasteur bien remplis. Au bout de 3 mois environ, on transvasa la bière dans d'autres ballons stérilisés à deux cols, qui furent placés dans une armoire à la température ordinaire. Moins de 8 jours après, la bière de *B* et de C était fortement attaquée de la maladie désignée plus haut sous le nom de trouble de la levûre, tandis qu'au bout de 14 jours, celle de *A* était encore parfaitement saine. Par conséquent, l'une des trois levûres de la bière malade, à savoir le Sacch. cerevisiæ, donnait un produit qui pouvait se conserver lorsqu'elle était seule présente

dans le liquide en fermentation, mais la maladie se déclarait dès que l'une des deux autres espèces, n'importe laquelle, était mélangée avec la première dans la proportion indiquée.

La fermentation marchant très lentement dans les ballons Pasteur, j'ai répété l'expérience avec des bocaux cylindriques recouverts de papier à filtrer préalablement passé à travers une flamme. De cette manière, on opérait aussi dans des conditions qui se rapprochaient davantage de celles des brasseries. Des 6 bocaux employés, deux étaient marqués *A*, deux, *B* et deux, *C*, et ils renfermaient chacun 1300 c. c. du même moût stérilisé. On sema dans chacun des bocaux *A* 2,50 c. c. du Sacch. cerevisiæ ci-dessus mentionné, et dans chacun des bocaux *B* et *C*, 2 c. c. de la même levûre, plus 0,50 c. c. de Sacch. ellipsoideus II dans *B* et 0,50 c. c. de Sacch. Pastorianus III dans *C*.

Dans cette expérience, comme en général dans toutes les autres, on a eu soin de maintenir exactement *A*, *B* et *C* dans les mêmes conditions, sauf en ce qui concernait l'addition des différentes levûres sur l'action lesquelles il s'agissait de se prononcer. La fermentation principale, basse dans *A* et *B* et avec de faibles phénomènes de fermentation haute dans *C*, se fit à la température de 14—15^{0} C. et dura 9 jours, après quoi la bière fut transvasée dans des bouteilles munies de bouchons en caoutchouc traversés par un tube recourbé qui descendait le long de leur paroi extérieure. Cette disposition avait pour but d'ouvrir à l'acide carbonique formé pendant la fermentation ultérieure une voie pour s'échapper, sans qu'on exposât en même temps le liquide à être infecté par les microorganismes du dehors. La fermentation ultérieure eut lieu à la température de 6—7^{0} C., et, au bout de 2 mois, on transvasa la bière dans des bouteilles en verre incolore préalablement stérilisées.

Toute la bière ainsi obtenue était claire et il n'était pas possible, à l'œil nu, d'y observer de la levûre; mais après 24 heures d'exposition à la température ordinaire d'un appartement, la bière de *B* et de *C* présentait déjà des symptômes de la maladie. Celle-ci ne fit qu'augmenter de jour en jour, et le 12^{e} jour la bière était pleine de levûre. La bière de *A*. au contraire, était encore parfaitement saine au bout de 15 jours.

J'ai obtenu les mêmes résultats en remplaçant. dans les expériences, le Sacch. cerevisiæ extrait de la bière malade par une culture pure du Sacch. cerevisiæ (levûre basse) employé dans la brasserie de Carlsberg.

Les expériences ayant ainsi montré que la maladie se déclare lorsque, à l'origine de la première fermentation, la levûre employée pour la mise en levain renferme une certaine proportion d'une des deux espèces ci-dessus mentionnées, la seconde question était de savoir comment ces ferments de maladie se comporteraient si on ne les introduisait dans la bière qu'à la fin de la fermentation principale, par conséquent lorsqu'on la met dans les caves de garde.

Dans ce but, j'ai exécuté, à l'aide des ballons Pasteur, quelques expériences analogues aux précédentes. Dans une première série, les deux levûres de maladie ont été introduits au commencement et, dans

une seconde série correspondante, à la fin de la fermentation principale. Après la fermentation ultérieure, la bière soutirée des deux séries ne présentait pas trace de la maladie. Au bout de quelques jours, celle-ci se déclara comme auparavant dans la bière *B* et *C* de la première série, après qu'elle eut séjourné quelques jours dans la laboratoire; mais toute la bière de la seconde série n'en fut pas attaquée et resta claire comme la bière *A* de la première série.

Ces expériences nous donnent donc ce renseignement intéressant, que *les deux ferments de maladie ne peuvent provoquer le trouble de la levûre lorsqu'ils ne sont introduits dans la bière qu'à la fin de la fermentation principale.*

On pourrait peut-être être tenté d'en conclure qu'il est superflu de se donner tant de peine pour nettoyer et enduire de poix les tonneaux de garde. Je dois donc rappeler que le résultat ci-dessus ne concerne que les deux levûres avec lesquelles il a été expérimenté. Mais, comme mes recherches antérieures l'ont constaté, il peut apparaître dans les tonneaux de garde, outre ces deux formes, divers autres microorganismes qui sont en état de provoquer dans la bière des maladies tout aussi graves que celle qui nous occupe.

Pour soumettre le résultat qui précède à une épreuve faite dans les conditions de la pratique, j'ai répété la même expérience avec de la bière de garde ordinaire et de la bière d'exportation prises dans les caves de fermentation de la brasserie de Carlsberg au moment où, la fermentation principale étant terminée, elles devaient passer dans les caves de garde. De chacune de ces espèces de bière, je fis remplir 3 barils, *A*, *B*, *C*, chacun de $16^1/_2$ litres, après quoi je semai dans *B* 10 c. c. d'une levûre assez épaisse de Sacch. ellipsoideus II, et dans *C* 10 c. c. d'une levûre également assez épaisse de Sacch. Pastorianus III; mais les barils *A* ne furent pas infectés. La levûre du Sacch. ellipsoideus II et celle du Sacch. Pastorianus III avaient été produites dans des cultures au moût, à la même température que les cellules de Sacch. cerevisiæ contenues dans la bière. L'expérience ayant ainsi été mise en train, les 6 barils furent placés dans une des caves de garde de la brasserie, où on les laissa $2^1/_2$ mois, par conséquent un temps relativement très court en ce qui concerne la bière d'exportation. La température de la cave était de 2^0 C.

On procéda alors au soutirage dans des bouteilles préalablement stérilisées, et put constater que la bière de tous les barils *A*, *B* et *C* était cependant claire et sans le moindre trouble, comme une bonne bière marchande. Après avoir été exposées pendant 12 jours à la température ordinaire d'un appartement, aucune des bouteilles ne présentait de trace de la maladie. *En un mot, la bière fortement infectée se conservait tout aussi bien que la bière non infectée.* Le résultat était donc le même que dans les expériences en petit faites au laboratoire.

Dans des recherches comme celles-ci, dont le but est d'intervenir directement dans la pratique, il est naturellement à désirer que les expériences soient, autant que possible, disposées dans les conditions qui se trouvent réalisées dans une exploitation industrielle. Cela n'a pas souffert de difficulté quant à la question précédente. Mais il en

est tout autrement de la première question que nous avons examinée, à savoir celle de l'infection pratiquée au commencement de la fermentation principale. Il est évident que, quelque désirable que cela fût, on ne pouvait songer à entreprendre les expériences dans la brasserie elle-même, car, suivant toute vraisemblance, la maladie aurait gagné assez rapidement toutes les caves de fermentation et occasionné ainsi de grandes pertes. Toutefois, pour me rapprocher autant que possible de la pratique des brasseries, je résolus de refaire sur une plus grande échelle mes expériences de laboratoire, de manière que la bière fermentée mise en tonneaux pût prendre place dans la cave de garde de la brasserie. Je me proposais en outre, par ces nouvelles expériences, de me procurer des renseignements sur les quantités de ferments de maladie qui doivent se trouver dans la levûre de la mise en levain pour que la maladie puisse se déclarer, et enfin sur l'influence que pouvaient exercer une atténuation plus ou moins forte de la fermentation principale et un séjour plus ou moins long dans les caves de garde.

Voici un exemple des expériences que j'ai exécutées en ayant en vue ces différentes questions.

Dans une pièce du laboratoire de Carlsberg se trouvent deux cuves à fermentation Pasteur, *A* et *B* (une copie, sous quelques rapports améliorée, de la cuve décrite dans les „Études sur la bière", p. 328) de la même grandeur et du reste semblables. La température, dans ce local, était en janvier de 7—10° C. Après avoir versé dans chacune des cuves 165 litres de moût aéré (13,5 % Ball.), le même qui est employé dans la brasserie pour la bière de garde ordinaire, on introduisit dans la cuve *A* 660 grammes d'une levûre épaisse de Sacch. cerevisiæ (levûre basse de la brasserie), et dans la cuve *B*, 644 gr. de la même levûre plus 16 gr. d'une levûre épaisse de Sacch. ellipsoideus II. Cette dernière avait été produite à la même température que le Sacch. cerevisiæ employé; les cellules des deux epèces étaient jeunes et vigoureuses. Les quantités relatives de la levûre et du moût étaient celles qu'on emploie dans la brasserie. Le moût avait une température de 7° C. au moment de la mise en levain. La mousse blanchâtre qui indique le commencement de la fermentation se montra dans les deux cuves au bout de c. 24 heures, et dans le cours de la fermentation principale, la température s'y éleva à 10° C.

Au bout de 8 jours, la quantité d'extrait était dans *A* de 7,6 et, dans *B*, de 7,5 % Ball. Les deux bières avaient le même aspect et le même goût. De la bière de chaque cuve on remplit alors un baril de 66 litres qui fut ensuite descendu dans la cave de garde, dont la température était de 2° C.

On laissa la fermentation se poursuivre dans la bière qui restait dans les deux cuves, et après qu'elle eut duré en tout 10 jours, la quantité d'extrait était de 6,7 % Ball. tant dans *A* que dans *B*. La bière avait le même aspect et le même goût que l'avant-veille; elle fut soutirée dans 4 barils plus petits, dont 2 de chaque cuve, et descendue comme les premières portions dans la cave de garde.

La bière des deux gros barils, dont la quantité d'extrait, au commencement de l'enmagasinage, était de 7,5 % Ball. environ, en

renfermait, au bout de $2^1/_3$ mois, 6 % tant dans *A* que dans *B*. On la soutira dans des bouteilles de verre incolore préalablement stérilisées, qui furent ensuite exposées dans une armoire à la température ordinaire d'un appartement. Aussitôt après le soutirage, les deux bières ne présentaient aucune trace de trouble, mais déjà au bout de 24 heures, un examen attentif pouvait en faire découvrir un commencement dans *B*, et après 5 jours la maladie y était bien distincte, tandis que la bière de *A* restait claire sans trouble de la levûre.

Les 4 petits barils, dont la quantité d'extrait, à leur entrée dans la cave de garde, était de 6,7 %, en renfermaient 3 mois après 5,9 %. La bière de *A* et de *B* paraissait être identique; elle était claire et sans mélange apparent de levûre. Comme dans le cas précédent, on soutira la bière de deux de ces barils dans des bouteilles qui furent ensuite placées dans l'armoire ci-dessus mentionnée. La maladie ne se déclara pas. Au bout de 12 jours, la bière tant de *B* que de *A* était encore claire et sans trouble de la levûre.

Les deux derniers barils restèrent de $^1/_2$ mois de plus dans la cave de garde, par conséquent en tout $3^1/_2$ mois. L'analyse avec le saccharomètre donna la même quantité d'extrait que dans les deux barils précédents. Le résultat fut aussi le même: après 16 jours, on ne distinguait encore aucune trace de la maladie. Comme on pouvait s'y attendre, la bière était plus claire que dans les cas précédents à cause de son plus long séjour dans la cave de garde.

Cette série d'expériences nous apprend que la maladie peut encore se déclarer lorsque le Sacch. ellipsoideus II constitue $^1/_{41}$, de la levûre de la mise en levain, mais seulement si la bière est conduite dans la cave de garde avec une quantité d'extrait d'au moins 7,5 % Ball., et si l'enmagasinage, dans ces conditions, prend déjà fin au bout de $2^1/_3$ mois. Par contre, si la fermentation se poursuit dans la cave de fermentation de manière que la quantité d'extrait se réduise à 6,7 %, et si l'enmagasinage dure au moins 3 mois (par conséquent le temps normal), la maladie ne se déclarera pas.

On doit donc conseiller aux brasseries dans lesquelles cette maladie s'est glissée une atténuation suffisamment forte dans la fermentation principale, et un enmagasinage qui ne soit pas trop court (au moins 3 mois pour la bière de garde ordinaire). Mais si la levûre employée pour la mise en levain renferme une quantité considérable du ferment de maladie, cela ne sera pas même suffisant.

J'ai répété l'expérience en introduisant dans la cuve *B*, au lieu du Sacch. ellipsoideus II, la même proportion de Sacch. Pastorianus III. Le résultat principal a été le même; il semble cependant que, dans cette expérience comme dans quelques autres, le premier de ces ferments est le plus redoutable des deux.

Lorsque de la bière basse normale, fabriquée avec une culture pure de Sacch. cerevisiæ, reste exposée pendant longtemps en bouteilles à la température ordinaire d'un appartement, elle forme en général un dépôt de levûre assez abondant; mais, si on la secoue, elle ne devient pas cependant trouble et opaque. Ce dépôt se divise

en effet en petits grumeaux et fragments, sans que les cellules se séparent sensiblement les unes des autres pour flotter dans le liquide, et toutes ces petites parties retombent rapidement au fond. Tout autrement se comporte le dépôt qui, en très peu de temps, prend naissance dans la bière malade, car il est sans consistance et, à la moindre secousse, remonte dans le liquide sous forme d'un nuage de cellules isolées. Si la bière est attaquée à un haut degré et qu'on la secoue fortement, elle devient aussi comme toute boueuse. En d'autres termes, la bière saine peut bien former un dépôt de levûre tout aussi grand que la bière malade, sans cesser cependant pour cela d'être potable.

Si une brasserie qui a souffert de ce mal a repris son exploitation à l'aide d'un nettoyage à fond des caves de fermentation, et après s'être procuré une levûre de bonne qualité, elle doit veiller avec soin à ce que la maladie ne soit pas ramenée par la lie des tonneaux de garde.

Dans plusieurs brasseries on ne prend aucune précaution à cet égard. La lie se répand dans les cours et est apportée directement dans les caves de fermentation, surtout par les chaussures des ouvriers, ou bien elle se dessèche au dehors et le vent en emporte les poussières sur les bacs où refroidit le moût. De là, les ferments de maladie se glissent dans les cuves de fermentation, où ils commencent à se développer. Au début, cela marche bien très lentement de sorte qu'on ne remarque aucun danger, mais peu à peu les cellules s'accumulent, et à la fin la levûre servant à la mise en levain renferme assez de levûre spontanée pour que la maladie puisse se déclarer. A partir de ce moment, elle se développe avec une rapidité extraordinaire, et toute la bière de la brasserie est bientôt de nouveau attaquée. C'est à l'occasion de cas pareils que, dans le monde des brasseries, on peut souvent entendre parler de cette maladie momme de quelque chose de mystique. „Si elle vient, dit-on, il n'y a qu'à s'incliner; essayer de la combattre ne sert de rien, c'est un malheur contre lequel personne ne peut se défendre.“ On change alors sa levûre, et si la nouvelle levûre de la brasserie *A* n'aide pas, on s'adresse à *B*, etc. Mais qu'il faille chercher et combattre la cause du mal dans l'exploitation elle-même, c'est à quoi l'on pense rarement.

Des espèces autres que le Sacch. Pastorianus III et le Sacch. ellipsoideus II peuvent sans doute aussi provoquer dans la bière le trouble de la levûre. Dans le 1er vol. 4e liv. p. 216 de se Compte-rendu, j'ai déjà émis l'opinion que l'espèce du groupe Pastorianus dont il y est parlé, était probablement du nombre. Il peut être bon de rappeler ici que le phénomène du trouble de la levûre se manifeste sous plusieurs formes. Sous ce nom est comprise toute une série de maladies différentes.

Le Sacch. Pastorianus mentionné en dernier lieu nous a également donné un exemple caractéristique du fait, que certaines espèces du genre Saccharomyces peuvent produire une bière d'un goût désagréable pour les connaisseurs.

Il s'en faut que le trouble de la bière soit toujours dû à des organismes. Assez général est, par ex., celui qui se produit lorsque

de la bière claire, après avoir été exposée à une basse température, devient opaline, intransparente, et ne recouvre sa clarté qu'après avoir été réchauffée. Ce phénomène, on l'explique ordinairement par la circonstance que, sous l'action du froid, il se sépare des substances protéiques qui se redissolvent lorsque la bière reprend sa température primitive, mais l'aspect opalin peut aussi provenir d'autres causes et se manifester sous d'autres formes. Il a été constaté, dans certains cas, qu'en ajoutant une assez petite quantité de Sacch. Pastorianus III à la levûre employée pour la mise en levain, on pouvait empêcher la bière de devenir opaline. Ainsi, tandis que de la bière fermentée à l'aide d'une culture pure de Sacch. cerevisiæ devint fortement opaline et resta telle, même après une exposition de plusieurs jours à la température ordinaire d'un appartement, la bière correspondante, qui était préparée de la même manière avec la seule différence que la levûre de la mise en levain avait été additionnée d'une petite portion de Sacch. Pastorianus III, était parfaitement claire aussitôt après le soutirage dans la cave de garde et continua à l'être. On doit donc supposer que, pendant la fermentation ultérieure, cette dernière levûre a fait disparaître les substances qui rendaient la première bière opaline. D'autres expériences ont au contraire montré que deux levûres qui, chacune prise à part, donnaient une bière claire, produisaient par leur mélange une bière opaline. Ces questions et d'autres analogues seront successivement soumises à un examen approfondi dans le laboratoire de Carlsberg.

Les espèces du genre Saccharomyces soulèvent en somme des problèmes d'une grande importance pour l'industrie des fermentations, et offrent sous ce rapport, au moins pour le moment, plus d'intérêt que les bactéries; mais tout ce domaine est resté jusqu'à présent comme un pays presque entièrement inconnu.

Développemet et constitution de l'endosperme de l'orge.

Études anatomiques préliminaires sur la question des grains tendres.

Par

W. Johannsen.

Ces recherches n'ont porté que sur les espèces d'orge cultivées qui, dans tous les points essentiels, présentent entre elles une grande conformité. Comme matériaux, j'ai sur tout employé le Hordeum distichon; les figures sont dessinées d'après cette espèce à moins qu'une autre ne soit indiquée.[1])

Pour les préparations microscopiques de jeunes fruits, je me suis presque toujours servi de procédé de M. Strasburger: durcissement dans l'alcool absolu et traitement subséquent par la glycérine et l'alcool. Les réactifs employés, sauf mention contraire, ont été préparés d'après les indications de M. V. A. Poulsen, Microchimie végétale, Paris 1882.

L'ovaire de l'orge, comme celui des autres graminées, ne renferme qu'un ovule, qui est adhérent au côté de l'ovaire (ventral ou du sillon), qui regarde la paillette supérieure. Il n'y a donc pas de funicule proprement dit; l'ovule sessile est fixé à la paroi de l'ovaire par une ligne d'attache assez longue. Toute la partie de l'ovaire située au-dessus de la cavité ovarienne est dépourvue de chlorophylle, et garnie de nombreux poils raides, pointus, à une ou plusieurs cellules et souvent ramifiés qui la font paraître d'une blancheur éclatante, tandis que la partie de l'ovaire qui entoure la cavité ovarienne est verdâtre, par suite de la présence de quelques couches de cellules du parenchyme interne qui renferment de la chlorophylle. Ces cellules sont surtout accumulées des deux côtés de la suture ventrale et tout près de celle-ci, et c'est pourquoi cette suture paraît à l'œil nu vert foncé dans une coupe transversale, bien qu'elle soit elle-même incolore. La partie supérieure de l'ovaire est divisée par une dépression en deux parties, dont celle qui regarde la paillette

---

[1]) Relativement aux ouvrages dont je me suis servi, je dois me référer au texte danois; je n'indiquerai ici que les principaux.

supérieure est beaucoup plus haute que l'antérieure (comp. Pl. I, Fig. 1), et se divise à son tour en deux lobes, l'un à droite et l'autre à gauche, qui forment chacun un vigoureux stigmate couvert de poils pennés (comp. Fig. 2). Entre les deux parties ci-dessus mentionnées, une fente ou un canal étroit descend verticalement dans l'ovaire (Fig. 1) presque jusqu'à la cavité ovarienne.

L'ovaire est traversé de bas en haut par quartre faisceaux, dont l'un dans la partie dorsale, vis-à-vis de la suture ventrale et un peu au-dessous d'une faible sinnosité de l'ovaire (Pl. I, Fig. 3 a); les deux suivants sont situés sur les côtés de l'ovaire et vont se perdre dans les stigmates (Plan I, Fig. 2 a, Fig. 3 b, c), tandis que le premier ne monte pas si haut. Le quatrième, qui est le plus fort et présente des vaisseaux bien distincts, suit la suture ventrale en dehors de la ligne d'attache de l'ovule et parallèlement à cette ligne (Fig. 3 d). En coupe transversale, la ligne d'attache apparaît comme une partie arrondie et formée de petites cellules (Fig. 3 e), d'où les deus téguments de l'ovule, l'épiderme du nucelle et l'épiderme de la cavité ovarienne tirent leur origine.

L'ovule est un peu recourbé en S. En effet si, sur une coupe longitudinale (Fig. 1), on part de la ligne d'attache, il s'élève d'abord, s'infléchit ensuite vers le bas et enfin vers le côté opposé de la chalaze, le micropyle étant tourné en dehors[1]). Du sommet de l'ovule les deux téguments forment une pointe qui pénètre bien avant dans le tissu conducteur venant des stigmates (Fig. 1 et 2). Chaque tégument se compose de deux couches de cellules; cependant ils en renferment un plus grand nombre dans la pointe ci-dessus mentionnée et près du micropyle, où le tégument externe présente une grande ouverture, tandis que le tégument interne n'a qu'une petite fente (Fig. 1 m). Dans cette partie supérieure dont il vient d'être question, on ne voyait pas distinctement comment se comportaient les couches du tégument externe; la couche extérieure du tégument interne ne semblait pas s'être devisée (comp. Pl. I, Fig. 11). On trouve des caractères correspondants chez le seigle; ils sont indistincts chez le froment.

Dans l'ovaire développé, le tégument externe, déjà avant la pollinisation, est très mou et ses cellules claires, à parois minces, sont en partie vides. Il semble que ce tégument sarve à conduire le tube pollinique après qu'il a atteint la cavité ovarienne[2]). Les tissus conducteurs proprement dits descendent, en se rapprochant l'un de l'autre, des stigmates dans l'intérieur des parties qui portent ces derniers (comp. Fig. 2). Les deux tissus conducteurs se rencontrent encore dans la région postérieure de la partie supérieure de l'ovaire (comp. Fig. 1), et s'avancent ensuite ensemble vers la cavité ovarienne en

---

[1]) Cfr. Hofmeister: Neue Beiträge z. Kenntniss d. Embryoentwickelung der Phanerogamen. II Monocotyledonen (Abhdl. d. k. sachs. Gesellschaft d. Wissenschaften Bd. VII p. 651) et Payer: Organogénie de la fleur. Paris 1857 p. 703.

[2]) Holzner, Botan. Centralblatt Bd. 12, 1882, p. 107.

passant successivement dans la région antérieure de l'ovaire. La petite fente mentionnée plus haut n'est ainsi entourée à sa base que de tissu conducteur et devient ainsi moins distincte. Les cellules de ce tissu sont étroites, molles, tres allongées, à parois minces et sans trace d'amidon; à un examen superficiel, elles cachent facilement la pointe des téguments.

Avant la fécondation, on trouve dans le sac embryonnaire une vésicule embryonnaire et deux synergides assez petits et à contours un peu vagues (Fig. 12 e & s); le noyau central est distinct de même que les antipodes (Fig. 12, a), qui se développent plus vite que les cellules sexuelles; il y eu a au moins six. Après la fécondation, peut-être déjà avant, les antipodes commencent à se diviser rapidement et le nombre des noyaux augmente beaucoup; j'en ai compté 31 et peut-être y en a-t-il davantage. En même temps, le sac embryonnaire s'élargit considérablement; il croît d'abord plus d'un côté que de l'autre, comme c'est surtout le côté tourné vers la partie dorsale de l'ovaire qui s'allonge fortement en se courbant (Pl. I, Fig. 9, 10). Par suite, les antipodes se trouvent transportés sur le côté du sac embryonnaire vers le sillon.

L'endosperme commence alors à se former. Je n'ai jamais réussi à observer la division du noyau central, mais n'ai aucune raison de douter que les indications générales de M. Strasburger se confirment également ici. Le noyau central doit, par des divisions rapides et successives, donner naissance à un grand nombre de noyaux filles. Ceux-ci sont logés dans le protoplasme et tapissent la paroi interne du sac embryonnaire; les antipodes et les cellules sexuelles restent cependant entre cette paroi et le jeune endosperme. L'ovaire a alors une longueur de 3,5 millimètres environ. La Fig. 3, Pl. I, représente une coupe transversale d'un pareil grain passant par le milieu de la cavité ovarienne, et la Fig. 8, une partie de cette coupe avec un plus fort grossissement. La paroi de l'ovaire[1]) se compose ici des couches de cellules suivantes: l'épiderme, un parenchyme incolore qui renferme de petits grains d'amidon, deux (çà et là, surtout dans le voisinage de la suture ventrale, 3 ou davantage) chouches de cellules chlorophyliennes allongées en travers et enfin l'épiderme de la cavité ovarienne. Puis vient le tégument externe qui maintenant est dépéri et en pertie disparu. Par contre, les cellules du tégement interne, de même que celles de l'épiderme du nucelle, sont encore riches en protoplasme et renferment des noyaux relativement gros. En dedans de cet épiderme, on voit le reste à demi déplacé du nucelle et au fond les jeunes noyaux de l'endosperme. Toutes les parties de l'ovule, y compris les téguments et son point d'attache, sont entièrement dépourvues de grains d'amidon.

Une coupe longitudinale correspondante donne une image un peu différente. Les cellules incolores du parenchyme apparaissent

---

1) Comp. aussi: Kudelka, „Entwickelung u. Bau d. Frucht u. Samenschale unserer Cerealien", Berlin, 1875, et Grønlund „Om Melbyg og Glasbyg", Kjobenhavn 1879, p. 29—32.

avec des parois assez droites; elles sont disposées en rangées longitudinales et sont un peu allongées dans le sens de la longueur de l'ovaire. Les cellules de chlorophylle paraissent par contre presque rondes. Il n'y a pas grande différence entre les coupes longitudinale et transversale des autres couches de cellules. Les noyaux de l'endosperme présentent la même image dans les deux sens.

Les cellules du parenchyme dans la paroi de l'ovaire sont, dans la phase représentée Fig. 3, beaucoup plus grandes qu'avant la fécondation et ont entre elles un peu moins de cohérence. Les cellules de chlorophylle sont également plus grandes qu'auparavant. Le tégument externe est bien plus dépéri et le faisceau vasculaire dans la suture ventrale, plus fort qu'avant la fécondation.

Si, à l'aide d'une aiguille, on étend une partie du revêtement du sac embryonnaire dans une goutte de glycérine (Plan I, Fig. 16), on voit qui la grandeur des noyaux de l'endosperme et leur distcnce mutuelle diminuent d'autant plus qu'ils sont plus voisins des antipodes (Fig. 16 a). C'est donc dans le voisinage de ces derniers que la division des noyaux de l'endosperme est le plus avancée, et c'est aussi là, par conséquent hors de la suture ventrale, que les parois des cellules se forment le plus tôt.

Pendant que le sac embryonnaire déplace de plus en plus le nucelle, le jeune endosperme poursuit son développement. L'ovaire croît en même temps, surtout en longueur (hauteur)[1]), les cellules, sauf celles des couches à chlorophylle, s'allongeant beaucoup dans cette direction.

A l'aide d'une aiguille, on peut facilement étendre dans la glycérine de grandes lamelles du jeune endosperme, et observer les différentes phases de la formation des parois des cellules. Mes observations ont toujours concordé avec les indications générales de M. Strasburger. Après la formation de leurs parois, les jeunes cellules commencent à s'allonger dans le sens radial vers la cavité du sac embryonnaire.

La Fig. 13, Pl. I, est une coupe transversale de l'endosperme d'un grain long de 4,5 millim. environ. On voit tout de suite que c'est sur le côté ventral (f), où il est en contact avec les antipodes, maintenant à moitié résorbés et non représentés sur la figure, que l'endosperme est le plus développé. La Fig. 14 montre une petite partie de la même coupe avec un plus fort grossissement. Les parois sont très minces et un peu crêpées (l'action de l'alcool). Les formes allongées des noyaux indiquent de prochaines divisions; la Fig. 17 reproduit différentes phases de la division. La jonction dite „Verbindungsfäden" ne forme pas ici la figure ordinaire ressemblant à un tonneau.

Pendant que l'ovaire croît toujours en longueur et peu seulement en volume, le sac embryonnaire est complètement rempli par l'endosperme. La rencontre en son milieu des cellules du côté dorsal et

---

[1]) Holzner „Die Gerste" (Der bayrische Bierbrauer, 1876, p. 200) indique plusieurs mesures qui s'accordent avec celle-là.

du côté ventral détermine la formation d'une ligne de soudure bien distincte (comp. Pl. II, Fig. 1). La partie voisine de la suture ventrale (en f) est constamment la plus développé; déjà en ce point — la longueur du grain est de 5 à 5,5 millimètres environ — la couche de cellules extérieure de l'endosperme a commencé à se différencier, elle est remplie de matière protéique et on n'y aperçoit que très indistinctement des cordons de protoplasme. Il n'y a encore pas trace d'amidon dans l'endosperme, et ce n'est qu'après plusieurs divisions de cellules qui semblent s'opérer simultanément dans l'endosperme tout entier que cette substance fait son apparition.

Le grain est alors long de 6 à 7 millim. et a commencé à croître un peu plus en volume. La Fig. 3, Pl. II, représente une coupe transversale de l'endosperme dans cette phase. La ligne de soudure est encore distincte, mais disparaît plus tard. Les grains d'amidon apparaissent d'abord dans les parties supérieures de l'endosperme, toutefois pas au sommet, à la pointe du grain. La coupe, qui passe un peu au-dessus du centre du grain, montre où prennent naissance les premiers grains d'amidon, à savoir autour de la ligne de soudure, au milieu des deux demi-longueurs du grain et dans deux parties voisines du côté ventral. On ne rencontre jamais d'amidon dans la couche extérieure de l'endosperme, mais, outre son riche contenu en protoplasme, on y trouve déjà dans cette phase un peu de matiére grasse.

La Fig. 5, Pl. II, reproduit avec un plus fort grossissement une partie de la Fig. 3. De la couche extérieure (o), dont le contenu est très abondant, dérivent les cellules à parois épaisses et sans amidon, qui sont disposées en trois rangées. Dans les cellules voisines de la ligne de soudure, qui limite la figure vers le bas, on aperçoit de petits grains dans le protoplasme qui entoure le noyau et dans les parties contiguës. L'iode[1]) ne les colore que faiblement en un bleu peu distinct. Mais si l'on emploie du chlorure de zinc iodé, les petits grains se gonflent et se colorent fortement en brun noir. La Fig. 6, Pl. II, représente quelques cellules traitées par ce réactif. Immédiatement avant que la présence de l'amidon puisse être constatée à l'aide du chlorure de zinc iodé ou de la potasse et de l'iode, le protoplasme qui entoure le noyau de la cellule est faiblement grumeleux; on a peut-être dans ces gruaux les „Stärkebildner" de Schimper sous une forme très indistincte.

Après que l'amidon a commencé à se former dans une cellule de l'endosperme, il ne semble pas que celle-ci se divise davantage; du moins je n'ai trouvé de l'amidon dans aucune cellule de l'endosperme en train de se diviser. Par contre, les divisions se pour-

[1]) La dissolution d'iode employée a été préparée comme il suit: à 1 partis d'iode dissoute dans 20 parties d'alcool, on ajoute 80 parties d'eau et, après ½ heure de repos, on filtre pour séparer l'iode qui s'est précipité. Une pareille dissolution faible d'iode est souvent à préférer à une plus forte, la coloration étant beaucoup plus égale.

suivent dans les cellules qui ne renferment pas de l'amidon, surtout dans le rayon périphérique de l'endosperme.

La Fig. 7 b, Pl. III, est une coupe transversale d'un grain long de 8,5 millim. environ. En la comparant avec Fig. 7 a, on constate que ce grain a aussi beaucoup grossi. La Fig. 8, Pl. II, montre, avec un fort grossissement, une partie d'une coupe transversale d'un grain ayant 8,5 millim. de long. On voit immédiatement que la couche de cellules extérieure de l'endosperme (Fig. 5, o) s'est, par des cloisons tant tangentielles que radiales, divisée en plusieurs cellules remplies d'un contenu grumeleux. La Fig. 10 fait voir les mêmes cellules telles qu'elles se présentent dans une coupe tangentielle. Dans ce sens, elles sont disposées d'une manière très irrégulière, tandis qu'en coupe transversale et surtout en coupe longitudinale, leur arràngement est plus régulier. Elles renferment maintenant une grande quantité de substances grasses et protéiques; cependant on n'y distingue pas encore clairement des grains d'aleurone.

En dedans de ces cellules viennent les cellules amylifères. C'est vers l'intérieur de l'endosperme que se trouvent les grains d'amidon les plus âgés et les plus gros, et vers la périphérie, les plus jeunes et les plus petits. Ils sont oblongs et de forme un peu irrégulière, tandis que dans l'endosperme complètement développé ils ont une forme lenticulaire assez régulière. Les très petits grains que, dans l'endosperme tout développé, on rencontre entre les gros grains d'amidon, n'existent pas encore. Les noyaux des cellules sont maintenant trés distincts. Les cordons du protoplasme ne se voient pas distinctement sans une préparation speciale (coloration); mais si, dans une coupe, on enlève l'amidon à l'aide de l'acide azotique étendu (env. 10 %), on reconnaît facilement que tous les grains d'amidon sont logés dans le protoplasme. Les parois inclinées en dedans des cellules de l'endosperme ne suivent pas sur la figure une direction exactement radiale à partier de la périphérie. Elle reproduit en effet une partie prise sur le côté de l'ovaire et où ces parois, par suite de la croissance non homogène de l'endosperme et du renflement qui en résulte, ont été un peu rejetées hors de leur direction primitive. Mais les Fig. 5, Pl. II, et 1, Plan III, sont dessinées d'après des parties prises sur le dos du grain, et la direction primitive y est conservée.

La Fig. 9, Pl. II, est une coupe transversale de la paroi de l'ovaire, correspondant à l'endosperme de la Fig. 8. Elle représente une partie peu éloignée de la suture ventrale. Les cellules de l'épiderme ont des parois plus épaisses qu'auparavant (comp. Pl. I, Fig. 8) et se sont allongées dans le sens tangentiel. Le parenchyme incolore est devenu beaucoup plus lâche, et ses cellules se sont aussi accrues dans le même sens pendant le grossissement du grain. Une partie des cellules intérieures du parenchyme sont maintenant complètement affaissées, tandis que les cellules vertes sont encore bien remplies; la figure en montre trois couches. L'épiderme intérieur et le tégument ont disparu ou presque disparu. Le tégument interne est encore distinct, de même que les cellules de l'épiderme du nucelle dont le nombre a beaucoup augmenté. Le nucelle lui-même est entièrement refoulé par l'endosperme, excepté tout près de la ligne d'attache.

Sur le côté dorsal du grain, toute la paroi de l'ovaire est bien plus comprimée que dans la figure.

Sur les coupes longitudinales, toutes les cellules de la paroi de l'ovaire, à l'exception des vertes, sont extrêmement allongées dans le sens du grand axe du fruit. Les cellules vertes se sont peut-être divisées. Dans cette phase, tout le fruit est plus fortement coloré en vert qu'auparavant, car les cellules à chlorophylle rayonnent maintenant plus facilement à travers le parenchyme incolore, mince et transparent. Les paillettes commencent à s'attacher au fruit lui-même.

La Fig. 7, Pl. II, est une coupe longitudinale du grain entier dans la même phase. L'embryon est loin d'être développé et doit encore refouler une grande partie de l'endosperme.

Après la phase qui vient d'être décrite, dans laquelle le grain entier renferme environ 70 % d'eau et l'endosperme se présente sous forme d'un mucilage laiteux et épais, le grain s'allonge bien encore un peu, mais croît surtout en volume, notamment au milieu. Par suite d'une croissance moins rapide dans la partie voisine de la suture ventrale[1]), l'endosperme s'infléchit de manière que sa coupe transversale se rapproche de la forme d'un fer à cheval qui, plus tard, divient de plus en plus réniforme. En même temps, les cellules se remplissent toujours davantage de réserves.

Lorsque le grain a une longueur de 9 millim. environ, qu'il renferme env. 52 % d'eau et se présente en coupe transversale comme la Fig. 7 e, Pl. III, la chlorophylle a commencé à s'altérer dans les cellules de la paroi de l'ovaire. Les cellules ont un contenu plus jaunâtre, excepté des deux côtés de la suture ventrale, où la couleur verte se maintient le plus longtemps. Dans la phase représentée Fig. 7 f, où le grain renferme 40 % environ de son poids d'eau, on voit encore à droite et à gauche de la suture des taches vert olive.

Lorsque le grain est complètement développé au point de vue anatomique, on n'y trouve plus de chlorophylle; la proportion d'eau est de 30 % environ, et l'endosperme a une consistance molle, céroïde et un peu tenace. La Fig. 7 g représente une coupe transversale d'un pareil grain, et l'on voit que le sillon apparaît ici comme une ligne fine qui va jusqu'au milieu de l'endosperme. Le grain a maintenant une longueur de 9 à 9,5 millim.[2]). Cette phase est en général désignée sous le nom de „maturité jaune“ („Gelbreife“). Toutes les feuilles sont flétries, les tiges sont jaunes ou fauves, avec des nœuds d'un vert olive sale, et le plus souvent complètement desséchées dans la partie supérieure voisine de l'épi. Les arêtes sont également jaunes ou fauves La paroi de l'ovaire est très comprimée

---

[1]) On a relevé plus haut (p. 63) que c'est dans le voisinage de la suture ventrale que le développement de l'endosperme était le plus avancé. Ce fait est sans doute en connexion avec cet autre, que la croissance se ralentit aussi plus tôt dans la même région.

[2]) Ces mesures, de même que les précédentes, ne sont que des moyennes approximatives; on trouve en effet beaucoup de grains mûrs plus petits et plus gros.

et adhérente aux paillettes d'un beau jaune, qui souvent encore ont un reflet rougeâtre. A partir de ce moment, le grain ne croît pas davantage, mais semble être entièrement achevé. Tout apport de substance au grain doit également avoir cessé, et il ne manque plus que le dessèchement nécessaire et les processus qui l'accompagnent pour qu'il soit complètement mûr. Anatomiquement parlant, on peut affirmer qu'il ne survient aucun changement après „la maturité jaune". On ne saurait, à priori, en dire autant au point de vue chimique ou physiologique; mais l'examen de cette importante question n'entre pas dans le cadre de ces études préliminaires.

Le grain d'orge complètement développé et desséché à l'air se compose d'un embryon, d'un endosperme et d'une enveloppe. Cette dernière, comme on sait, comprend le péricarpe, l'enveloppe séminale et (à l'exception des orges nues) les deux paillettes, qui adhèrent assez fortement au fruit.

La Fig. 3, Pl. III, est une coupe transversale de l'enveloppe du côté dorsal du grain après le traitement par la dissolution de chlorure de zinc (60 % env.). Près du sillon, sur le côté ventral du grain l'enveloppe n'est pas aussi comprimée qu'ailleurs.

En coupe transversale, la ligne d'attache apparaît comme une partie un peu arrondie, d'un brun foncé, d'où le tégument interne, en général aussi coloré, et l'épiderme du nucelle tirent leur origine. De cette ligne d'attache, qui, vue en coupe longitudinale, se présente comme une longue raie sombre („Pigmentstrang") rayonnent vers l'endosperme quelques files de cellules allongées, vides, en partie affaissées, qui sont à considérer comme des restes du nucelle (Pl. III, Fig. 6 et 6 a). Ces deux figures reproduisent le sillon en entier ou en partie, tel qu'il se montre dans la coupe transversale du grain mûr entièrement développé (comp. Pl. III, Fig. 7 g) et du grain encore vert et un peu moins développé (comp. Pl. III, Fig. 7 e et f). Sur la Fig. 6, on voit dans ce dernier, entre le reste du nucelle et l'endosperme, une grande cavité[1]) qui se forme déjà dans des phases bien antérieures. On voit également que l'enveloppe et le reste du nucelle, près du sillon, ne pénètrent pas profondément dans le grain, comme chez le seigle et le froment, mais demeurent presque en dehors. La ligne étroite qui, dans la coupe transversale du grain mûr, aboutit environ au milieu de l'endosperme, n'est donc, dans le grain d'orge, que la limite entre les deux parties qui viennent se rejoindre du côté ventral infléchi de l'endosperme[2]). Le long de cette limite,

---

[1]) M. Novacki., après avoir mentionné la formation d'une pareille cavité chez le grain de froment, dit que par là se trouve rompu le pont par lequel passent les substances servant à l'alimentation de l'endosperme. Cela n'est pas exact; M. Novacki n'a pas tenu compte du rôle de l'osmose dans le transport des matières nutritives, et a oublié que l'endosperme n'a jamais été en liaison organique avec le reste du nucelle.

[2]) Cette indication est en opposition avec celle de M. Kudelka: „Zur Zeit der Vollreife reicht eine schmale Parthie des Fibrovasalstranges

les couches extérieures des cellules de l'endosperme ont des formes très irrégulières et des parois épaisses, et sont en partie vides.

L'embryon, dans ce qui précède, a été presque complètement laissé de côté. M. Nörner[1]) a décrit (Hord. vulg.) les premières phase de son développement. Mes observations s'accordent avec les siennes. M. Holzner dépeint brièvement son développement ultérieur, la formation de ses organes et donne de bonnes figures schématiques.

Lorsque le fruit est encore tout jeune, le petit embryon croît au sein de l'endosperme mou et en est presque complètement enveloppé. Pendant que l'embryon, en croissant, épuise et refoule peu à peu les cellules les plus voisines, les parois de cellis-ci, en tant qu'elles ne sont pas dissoutes, s'amoncellent les une sur les autres et finissent par former une couche assez épaisse qui sépare de l'embryon les cellules amylifères de l'endosperme. Les cellules non amylifères de l'endosperme entourent au contraire, mais seulement dans une seule couche, la partie supérieure de l'embryon; elles diviennent de plus en plus petites et disparaissent à la fin complètement. La Fig. 2, Pl. III, est trop petite pour qu'on puisse la voir; mais je puis me référer à M. Lintner: Lehrbuch der Bierbrauerei Braunschweig 1885, p. 25 et 31, Fig. 5 et 8, dessins qu'on trouve aussi chez M. Holzner l. c. M. Kudelka (l. c. p. 11) donne la même indication.

La partie clypéiforme de l'embryon contiguë aux cellules comprimées et vides de l'endosperme est le cotylédon (Warming), qui se distingue par son épiderme particulier. Il y a 4—6 radicules, toutes enfermées dans la coléorrhize, qu'elle percent lors de la germination. La gemmule est formée de plusieurs jeunes feuilles qui se recouvrent les unes les autres en forme de cornet. L'embryon ne renferme pas d'amidon, mais est riche en substances grasses et protéiques.

L'endosperme contient comme réserves surtout des hydrates de carbone et des substances grasses et protéiques. L'amidon et la cellulose sont les seuls hydrates de carbone qu'on ne puisse reconnaître au microscope.

Les substances protéiques sont répandues dans tout l'endosperme; dans les cellules amylifères, elles constituent la partie principale du „réseau" où les grains d'amidon sont logés. Ce réseau a sa plus grande épaisseur dans les cellules voisines de la périphérie de l'endosperme et dans sa partie supérieure; il est beaucoup plus mince dans les cellules plus profondément situées.

Les substances grasses ne se trouvent en grande quantité que dans les trois couches extérieures de l'endosperme, qui ont aussi des parois très épaisses dont la cellulose se dissout en majeure partie

---

(il entend sans doute par là le faisceau fibro-vasculaire, la ligne d'attache et le reste du nucelle) bis in die Mitte des Kornes, und es umgeben ihn stark verdickte Kleberzellen". M. Holzner dit que quelques cellules dues à une formation cellulaire libre doivent se produire dans la cavité dont il s'agit. Je n'ai jamais rien vu de pareil.

[1]) Flora 1881, No. 16.

pendant la germination et sert sans doute ainsi comme réserve. Les cellules contenant des substances grasses ne sont pas amylifères, mais renferment des grains d'aleurone.

La Fig. 1, Pl. III, est une coupe transversale de la partie dorsale du grain et représente un fragment de l'endosperme. La préparation, qui provient d'un grain dur et sec, a été traitée par une dissolution bien fluide de baume de Canada dans le chloroforme, et n'est par suite que peu gonflée; son aspect répond à peu près à celui de l'endosperme desséché à l'air. Les parois des cellules se montrent surtout racornies.

Dans le haut de la figure, on voit les cellules oléifères[1]); dans l'une d'elles, on a, outre le noyau, reproduit quelques petits corps ronds. La Fig. 4 fait voir ces cellules dans une coupe tangentielle passant par la partie dorsale du grain; vues ainsi, elles n'ont ni forme ni disposition régulière.

Relativement au contenu de ces cellules, on trouve plusieurs indications anciennes et nouvelles, dont nous citerons les principales. M. Hartig[2]) dit de l'endosperme des céréales que la couche de cellules extérieure sans exception ne renferme que du „Klebermehl" à grains fins, et indique en même temps (l. c. p. 121) que les grains de protéine des céréales restent longtemps dans l'eau sans se dissoudre, ce qui doit beaucoup faciliter l'observation.

M. S. L. Schenk[3]) a fait une recherche spéciale sur les cellules non amylifères de l'endosperme du froment, et trouvé qu'elles ne renferment pas beaucoup de protéine. Le réactif de Millon n'en colore pas le contenu, tandis que les cellules amylifères se colorent très fortement. M. Schenk appelle avec raison l'attention sur l'insuffisance de la réaction de l'iode pour constater la présence des substances protéiques. Suivant lui, les petits grains réfringents qu'on trouve dans les cellules sont insolubles dans les acides étendus et le suc gastrique artificiel, et ne peuvent par conséquent se composer de protéine („Kleber"). Les réactifs essayés pour décéler différentes autres substances ont donné un résultat négatif.

Chose singulière, la richesse des cellules en matières grasses a échappé à l'attention de M. Schenk, bien qu'elle ait été mentionnée par plusieurs auteurs, entre autres par M. Sachs et, avant lui, par MM. Payen et Trecul.

En examinant dans de l'eau des coupes d'un grain d'orge mûr (gelbreif) traité depuis longtemps par l'alcool, j'ai observé dans les cellules susmentionnées un réseau protoplasmatique ou systéme de cavités bien distinct. Les petits grains réfringents étant, d'après M. Schenk,

---

[1]) Le nom allemand „Kleberzellen" est une combinaison très peu heureuse de la dénomination „Klebermehl" (grains d'aleurone) de M. Hartig et du mot „Zellen". Les cellules en question n'ont rien de commun avec le „Kleber" (gluten). Cette substance est un produit qu'on extrait de la farine du froment.

[2]) Entwichelung des Pflanzenkeims 1858.

[3]) Anatomisch-physiologische Untersuchungen, Wien 1872, p. 3.

insolubles dans les dissolvants ordinaires des substances protéiques, il était à supposer que les cavités avaient renfermé des globules ou des gouttes de graisse qui s'étaient dissoutes dans l'alcool. En soumettant au même examen des coupes d'endosperme desséché, on observe dans les cellules non amylifères, outre de grosses gouttes huileuses, un certain nombre de petits corps ronds très réfringents et de grosseur peu variable.

Ce sont ces corps qui, en général, passent pour être des grains de protéine; mais comme ils sont colorés en brun noir par l'acide osmique et ne se colorent que lentement en jaune par la dissolution d'iode, il en résulte qu'ils sont formés de matière grasse. Ce sont évidemment ces corps que M. Schenk a vus et qu'il a déclaré avec raison ne pas être de nature protéique. Outre ces globules de graisse, j'ai constaté la présence de fragments d'un réseau protéique à mailles fines qui tantôt est coloré par l'acide osmique et tantôt pas.

En observant les préparations dans de la glycérine concentrée ou iodée, il est difficile de décider si les petits grains réfringents qu'on voit alors sont des grains d'aleurone ou des globules de graisse, et comme des grains d'àleurone facilement solubles ont été confondus avec des gouttes d'huile, j'ai emqloyé la méthode de M. Pfeffer[1]), qui passe pour être à l'abri de cette erreur. D'ailleurs, ainssi qu'il a été dit plus haut, M. Hartig considère les grains d'aleurone des Graminées comme appartenant aux grains les plus résistans. Des coupes tangentielles faites à sec de grains d'orge, de froment et de seigle (on obtient ainsi de plus grandes lamelles formées seulement des cellules dont il s'agit) restèrent plusieurs jours dans une dissolution à 2 % de bichlorure de mercure dans l'alcool absolu, traitement après lequel les grains d'aleurone même les plus facilement solubles, doivent être insolubles dans l'eau. Les préparations furent ensuite, comme le recommande M. Pfeffer, mises directement dans de l'eau et examinées dans de la glycérine, en général après avoir été colorées avec la dissolution d'iode ou le bleu d'aniline. On n'y découvrit jamais qu'un réseau plus ou moins régulier sans grains (Fig. 4, b).

Si les préparations sont de nouveau traitées par l'alcool, puis par l'éther et qu'on achève de les sécher à une douce chaleur artificielle, on peut, en les recouvrant d'une glycérine épaisse et en se débarrassant avec une aiguille des grosses bulles d'air qui se forment au-dessus de la préparation, observer de petites bulles d'air rondes et sombres dans les nombreuses petites cavités (Fig. 4, c), qui par conséquent doivent avoir été vides. Il était donc très vraisemblable que, dans les cellules non amylifères de l'endosperme, il n'y avait pas des grains d'aleurone mais des globules de graisse logés dans un réseau protéique.[2])

Mais en préparant des coupes de grains d'orge secs pour les mettre dans du baume de Canada, j'observai que les petits grains

[1]) Pfeffer: Untersuchungen über die Proteinkörner, Pringsheims Jahrbücher f. wiss. Botanik, Bd. 8, 1872, p. 440—441, 445.

[2]) Confr. Bot. Centralblatt, 1883, Bd. 15, p. 305.

réfringents n'étaient pas solubles dans le chloroforme. De pareilles coupes, qui avaient séjourné quelque temps dans du chloroforme ou du benzol ($C_6 H_6$), laissaient voir distinctement des grains logés dans un léger réseau (Fig. 4, d) après avoir été mis dans du baume de Canada. Je m'assurai que ce n'étaient pas des cavités en séchant à une douce chaleur artificielle les coupes traitées par le chloroforme, et en les mettant dans de la glycérine, et ne découvris alors pas autre chose que des fentes fines, irrégulières et remplies d'air entre les petits grains ronds, fentes dues sans doute à la contraction du réseau appauvri par le départ de la matière grasse.

Les grains ainsi observés ne pouvant être ni une matière grasse ni de l'amidon, doivent donc être des grains d'aleurone. Les indications de MM. Hartig et Schenk ne concernent pas par conséquent les grains d'aleurone, mais les petites gouttes de matière grasse qui doivent se séparer du réseau lorsqu'on le traite par des liquides aqueux.

Les grains d'aleurone, chez l'orge, le seigle et le froment sont par contre très fortement influencés par l'eau malgré l'action de l'alcool mercuré, et, en se gonflant, donnent au contenu des cellules l'aspect d'un réseau dont les vides sont les vacuoles des grains d'aleurone, et dont les cloisons sont formées par la fusion de la masse mitoyenne vide de matière grasse avec les couches extérieures de ces grains. L'alcool mercuré ne se borne pas à enlever la matière grasse, mais empêche aussi la destruction du contenu des cellules d'aller plus loin qu'il ne vient d'être dit, tandis que ce contenu, dans les coupes non durcies, est rendu très indistinct par l'influence de l'eau et le départ des gouttes de matière grasse.

Les trois couches de cellules extérieures non amylifères de l'endosperme contiennent donc des grains d'aleurone peu résistants logés dans une masse fondamentale protoplasmatique riche en matières grasses. Les noyaux sont très distincts. Les parois sont épaisses et renferment une assez grande quantité de cellulose. Chez le seigle et le froment, la couche de cellules extérieure de l'endosperme est identique avec les trois de l'orge.

En dedans de ces trois couches de cellules se trouvent les cellules amylifères de l'endosperme, dont les premières sont plus petites et ont des parois plus épaisses et plus fermes que celles qui sont situées plus bas. Les grains d'amidon sont logés dans une masse protéique peu grumeleuse qui, en coupes minces, se présente comme un réseau. On n'y trouve pas des grains d'aleurone proprement dits; les gruaux sont trop indistincts pour mériter cette dénomination. Les grains d'amidon, dans les cellules placées vers la périphérie[1]) et à la pointe du grain, sont bien moins nombreux que

---

[1]) La région autour de la fente ou du pli qui pénètre dans le milieu de l'endosperme appartient à la périphérie primitive de ce dernier. Les grains d'amidon ne sont également ici que de grosseur moyenne ou même plus petits. La masse ou le réseau protéique, quoique fort, n'est pas aussi épais que dans les autres cellules amylifères moins comprimées de la périphérie.

plus bas dans l'endosperme; comme le montre la Fig. 1, ils sont à peu près d'égale grosseur et beaucoup plus petits que les gros grains des cellules intérieures. Plus on avance vers les parties centrales, plus est grande la richesse des cellules en amidon et plus augmente la grosseur des grains; à partir de la deuxième ou de la troisième couche, apparaissent les tout petits grains d'amidon, qui sont logés de la même manière que les gros et mélangés avec eux.

Le réseau protéique dans les cellules devient de plus en plus fin vers le centre du grain, mais ne manque nulle part. Sur les coupes minces des grains durs ou glacés secs, dont le contenu des cellules de l'endosperme n'est pas aussi friable que chez les grains tendres, on distingue très nettement le réseau en les mettant dans une dissolution assez fluide de baume de Canada. Les grains d'amidon ayant à très peu près le même pouvoir réfringent que le baume, on ne les y voit pas, mais ils ont une ressemblance frappante avec des cavités dans la masse fondamentale riche en protéine, le protoplasme. Chez les grains tendres dont le contenu des cellules de l'endosperme est facilement friable, on a cru quelquefois que le réseau protéique faisait défaut, notamment dans les cellules intérieures. Ce n'est cependant pas le cas. Si l'on durcit les grains (de préférence, après les avoir laissés tremper 1 à 2 jours dans l'eau) avec de l'alcool absolu, et les traite ensuite, suivant le procédé de M. Strasburger, par un mélange, d'alcool et de glycérine, on peut facilement obtenir des coupes minces mais cohérentes. Qu'on opère avec des grains tendres ou des grains glacés, il est toujours facile, en le colorant, de rendre le réseau distinct, surtout si la préparation, après avoir été lavée dans l'alcool, l'éther ou le chloroforme, est mise dans du baume de Canada. Le réseau protéique ne semble pas se teindre si fortement dans les cellules amylifères intérieures que dans les cellules extérieures.

Le réseau peut aussi être rendu distinct (après le lavage, si l'on emploie des grains durcis) en traitant pendant 15—30 minutes, sur le porte-objet, la préparation par l'acide nitrique étendu (15 à 25 $^0/_0$) additionné de quelques gouttes d'aloès nitrique[1]). Après que la préparation, qui reste toujours sur le porte-objet, a été lavée avec précaution avec de l'eau, on ajoute de la glycérine et place le couvre-objet.

La Fig. 5, Pl. III, montre le réseau de quelques-unes des cellules amylifères extérieures sur le côté du grain, et la Fig. 8, celui d'une cellule plus profondément située.

Le noyau des cellules amylifères est tout à fait indistinct.

Je n'ai pas trouvé de méats intercellulaires dans l'endosperme de l'orge. Les parois cellulaires de l'endosperme forment un tout et il n'y à pas de cellules libres. Les nombreuses figures qui représentent, chez l'orge, le seigle ou le fromeut, des cellules isolées chacune avec ces propres parois, ont besoin d'une rectification.

---

[1]) „Liqour picronitricus", „Aloebeize", „Scheidewasserbeize".

Les grains d'orge et de froment séchés à l'air sont appelés „tendres“ lorsqu'ils sont mous et que leur section présente un endosperme d'un blanc de neige velouté, qui est très poreux et friable; on dit qu'ils sont „glacés“, lorsque de l'endosperme est dur, ferme, diaphane et que la section en est plus ou moins foncée. Il existe un grand nombre de transitions entre les deux types. Dans les grains demi-tendres, et les parties intérieures de l'endosperme sont ordinairement tendres, et les parties extérieures, glacées.

MM. Nowacki et Grønlund ont respectivement trouvé pour le froment et l'orge que, dans les cellules de l'endosperme des grains tendres, il y avait de l'air entre les grains d'amidon, tandis qu'il n'y eu avait pas dans celles des grains glacés. M. Samsøe Lund a cependant indiqué dans l'endosperme de grains glacés la présence de quelques bulles d'air, et M. Grønlund a plus tard émis l'opinion qu'on trouve tantôt plus tantôt moins de bulles d'air dans les grains tendres que dans les grains glacés.

Les observateurs qui précèdent ont pratiqué leurs coupes à l'aide d'un rasoir, suivant la méthode ordinaire. En opérant ainsi, il arrive presque toujours que les coupes des grains glacés secs se brisent et que l'air s'y introduit, ce qui rend le résultat incertain.

On évite cet inconvénient en procédant comme il suit. Après avoir coupé le grain et en avoir lissé les surfaces mises à nu avec le rasoir, on en presse les morceaux, par le côté de la section, dans un mélange très épais de baume de Canada et de chloroforme, en ayant soin qu'aucune bulle d'air ne pénètre entre les surfaces lissées et le baume. Celui-ci est mis sur on porte-objet ou un couvre-objet pas trop petit, que, pour plus de fixité, on colle sur une petite plaque de verre avec de la gomme arabique.

Après que le baume est devenu solide et dur, on enlève de chaque morceau avec une petite lime ou un couteau une quantité suffisante pour qu'il en reste une plaque d'une épaisseur convenable, dont on lisse la surface avec le rasoir. La préparation est ensuite recouverte d'une couche de baume et mise sous un porte- ou couvre-objet, et après l'avoir laissée sécher, on dissout la gomme arabique dans de l'eau froide et enlève la plaque de verre.

On obtient ainsi avec les grains glacés des plaques tout à fait diaphanes qui ne renferment pas des bulles d'air, tandis qu'on en trouve un grand nombre dans les cellules de l'endosperme des grains tendres, et elles sont d'autant plus nombreuses qui l'endosperme est plus tendre.

Comme les cellules de l'endosperme des grains tendres se désagrègent si facilement, les espaces remplis d'air doivent être distribués dans toute leur masse et non pas seulement sur leurs parois. Qu'ils ne remplacent pas le réseau protéique, cela résulte de ce qui a été dit p. 72.

C'est donc la présence d'espaces remplis d'air dans les cellules amylifères de l'endosperme qui caractérise les grains tendres. Outre cette particularité, on a aussi cherché d'autres différences anatomiques entre les deux espèces de grains. MM. Nowacki et Grønlund ont ainsi émis l'opinion que le réseau protéique manquait totalement

ou en partie dans les cellules de l'endosperme des grains tendres, mais nous avons vu que c'est inexact.

M Holzner croit que les grains d'orge glacés renferment un nombre relativement moins grand de gros grains d'amidon que les grains d'orge tendres. M. Thausing partage cette opinion et fait, bien à tort, complètement abstraction de la présence ou de l'absence des espaces remplis d'air. Les cellules extérieures les plus glacées des grains demi-tendres ne renferment pas de tout petits grains d'amidon, mais on les trouve mélangés avec les gros en nombre d'autant plus grand qu'on pénètre davantage au milieu du grain, c'est-à-dire dans les parties les plus tendres. De plus, l'endosperme tendre ne peut avoir l'aspect pulvérulent ou farineux, quelle que soit la grosseur des grains d'amidon. lorsque les espaces remplis d'air font défaut. Enfin on ne peut constater aucun changement relativement aux grains d'amidon, lorsque les grains glacés, après avoir été trempés dans l'eau et puis séchés, sont devenus tendres, de même que le réseau protéique semble n'avoir subi aucune modification, abstraction faite des espaces remplis d'air qui s'y sont formés.

Autant qu'on en peut juger sans recourir à des numérations qui seraient d'une exécution difficile, il semble qu'en comparant des parties correspondantes de l'endosperme (et ce sont les seules qu'on doive comparer) dans des grains durs et tendres de la même récolte, les premiers rénferment un bien plus grand nombre de petits grains d'amidon que les seconds. On peut cependant rencontrer des différences analogues dans une récolte ne comprenant que des grains glacés. Il en est de même relativement à l'étendue du réseau protéique où les grains d'amidon sont logés.

Que la couleur et l'éclat de l'enveloppe soient en grande partie déterminés par l'intérieur diaphane et glacé ou opaque et tendre du grain, cela est évident. Lorsqu'on écrase des grains glacés, les paillettes changent aussitôt de teinte. Celles qui accompagnent ces grains sont souvent très blanches. L'épaisseur de l'enveloppe, comme l'a déjà constanté M. Grønlund, n'est pas dans un rapport déterminé avec le caractère tendre ou glacé de l'endosperme.

Quant à la forme et à la grandeur des grains, il ne semble y avoir aucune règle. Dans la même récolte, les grains glacés seront très souvent les plus longs et les moins beaux.

Explication des Planches.

Planche I.

Fig. 1, schématisée comme les Fig. 2 et 3. Grossissement c. $\frac{16}{1}$. Coupe longitudinale médiane de l'ovaire de l'orge peu après la fécondation. A gauche, le côté ventral; à droite, le côté dorsal. *a*, tissu conducteur; *b*, sommet des téguments; *d*, faisceau vasculaire dans la suture ventrale; *m*, micropyle, qui, dans les jeunes ovaires, est tourné plus de côté; *se*, sac embryonnaire avec son contenu; *chl*, cellules chlorophylliennes.

Fig. 2, c. $\frac{16}{1}$. Coupe longitudinale perpendiculaire au plan médian; même phase que la Fig. 1. La coupe descend obliquement à travers les stigmates et le tissu conducteur. *a*, *b* et *chl*, comme dans la Fig. 1; *c*, faisceaux vasculaires, qui se perdent en haut dans les stigmates.

Fig. 3, c. $\frac{21}{1}$. Coupe transversale de l'ovaire menée par le milieu de la cavité ovarienne. L'endosperme se compose d'une couche de cellules nues. *a*, *b*, *c*, *d*, faisceaux vasculaires; *e*, point d'attache de l'ovule; *chl* et *ie*, comme dans la Fig. 8.

Fig. 4—7, c. $\frac{4}{1}$. Coupes longitudinales de l'ovaire de l'Hordeum macrolepis var. nigr. 4 et 5, pendant la fécondation; 6 et 7 peu après; *l*, paléoles.

Fig. 8, c. $\frac{250}{1}$. Partie de la Fig. 3; *e*, épiderme; *p*, parenchyme incolore, amylifère; *chl*, cellules vertes et amylifères allongées dans le sens transversal; *ei*, épiderme de la cavité ovarienne; *ie*, tégument externe; *ii*, téguments interne; *en*, épiderme du nucelle; *n*, reste du nucelle; *end*, endosperme jeune, cellules nues.

Fig. 9, c. $\frac{70}{1}$. Sac embryonnaire avant la fécondation (cfr. Fig. 12).

Fig. 10. Le même peu après la fécondation; orienté comme dans la Fig. 9, avec le même grossissement. Le noyau central (*c*) a peut-être commencé à se diviser; les antipodes (*a*) ne sont plus au fond du sac embryonnaire; dans la préparation, ces cellules se sont détachées de leur place en *x*; *e* & *s*, vésicule embryonnaire et synergides.

Fig. 11, c. $\frac{250}{1}$. Sommet des téguments dans l'ovaire non encore fécondé; *ie*, tégument externe; *ii*, tégument interne, dont la couche intérieure s'est divisée; *en*, épiderme du nucelle. Préparation par la potasse.

Fig. 12 = Fig. 9, c. $\frac{250}{1}$. Les lettres comme dans la Fig. 10. Les cordons du protoplasme ont été dessinés trop épais. Un des antipodes s'est détaché pendant la préparation.

Fig. 13, c. $\frac{70}{1}$. Coupe transversale de l'endosperme dans un grain long de 4,5 millimètres. *f*, côté du sillon (ventral).

Fig. 14, c. $\frac{250}{1}$. Partie de la Fig. 13.

Fig. 15, c. $\frac{4}{1}$. Coupe longitudinale du fruit dans la même phase.

Fig. 16, c. $\frac{120}{1}$. Partis de l'endosperme, *end*, avec quelques antipodes, *a*. La figure correspond aux Fig. 3 et 8.

Fig. 17, c. $\frac{250}{1}$. *a-g*, Différentes formes de noyaux de cellules en train de se diviser. Correspond aux Fig. 13—15.

Planche II.

Fig. 1, c. $\frac{70}{1}$. Coupe transversale. Moitié de l'endosperme d'un grain long de 5 à 5,5 millim. *s*, ligne de soudure; *o*, cellules de la couche extérieure qui ont déjà commencé à se différencier près du sillon.

Fig. 2, c. $\frac{250}{1}$. Partie de la Fig. 1. *s*, comme dans la Fig. 1.

Fig. 3, c. $\frac{4}{1}$. Coupe transversale d'un grain long de 6 à 7 millim. *s*, ligne de soudure, comme dans la Fig. 5. Les parties sombres indiquent les points où se montrent d'abord les grains d'amidon.

Fig. 4, c. $\frac{4}{1}$. Coupe londitudinale du grain dans la même phase; *emb*, embryon; *end*, endosperme; *e*, ligne d'attache de l'ovule.

Fig. 5, c. $\frac{250}{1}$. Partie de la Fig. 3 (*m*). *s*, ligne de soudure; *o*, cellules ne renfermant jamais de l'amidon et dont il n'y a encore qu'une seule couche (excepté près du sillon); l'amidon se forme dans les cellules voisines de *s*.

Fig. 6, c. $\frac{250}{1}$. Cellules d'endosperme avec de tout jeunes grains d'amidon rendus distincts par du chlorure de zinc iodé.

Fig. 7, c. $\frac{4}{1}$. Coupe longitudinale schématisée d'un grain long de 8,5 millim. *emb*, embryon; *end ab*, endosperme, en partie absorbé et épuisé par l'embryon; *ps*, *pi*, paillettes, qui ont commencé à se fixer au fruit; *e*, ligne d'attache de l'ovule; *n*, reste du nucelle. Au dedans, on voit un long espace vide.

Fig. 8, c. $\frac{250}{1}$. Coupe transversale de l'endosperme d'un grain semblable. Partie vue du côté dorsal; *o*, comme dans la Fig. 5.

Fig. 9, c. $\frac{250}{1}$. Coupe transversale du péricarpe d'un grain semblable. Partie voisine de la suture ventrale; les lettres comme dans la Pl. I, Fig. 8.

Fig. 10, c. $\frac{250}{1}$. Coupe tangentielle des cellules de la Fig. 8.

Planche III.

Fig. 1, c. $\frac{250}{1}$. Coupe transversale d'un endosperme mûr et sec dans du baume de Canada. Partie du côté dorsal d'un grain glacé. *o*, comme dans la Pl. II, Fig. 5.

Fig. 2, c. $\frac{6}{1}$. Coupe longitudinale schématisée d'un grain mûr. *e*, ligne d'attache ou „Pigmentstrang"; les lettres comme dans la Fig. 6 *a*.

Fig. 3, c. $\frac{250}{1}$. Coupe transversale de toute l'enveloppe. Partie du côté dorsal traitée par le chlorure de zinc; *p*, paillette; *ep* & *t*, péricarpe et test.

Fig. 4, c. $\frac{250}{1}$. Coupe tangentielle des cellules oléifères (*o* de la Fig. 1); les parois eu sont gonflées; pour leur contenu, voir le texte.

Fig. 5, c. $\frac{360}{1}$. Cellules amylifères de la région périphérique de l'endosperme sur le côté du grain. On a enlevé les grains d'amidon pour faire voir le réseau protéique; conf. Fig. 8.

Fig. 6, c. $\frac{21}{1}$. Partie du sillon d'un grain encore vert et assez développé (Fig. 7, *f*). Coupe transversale. *d*, faisceau vasculaire; *e*, point d'attache; *n*, reste du nucelle; *o*, cellules oléifères de l'endosperme; *h*, cavité remplie de liquide; *p*, paillette.

Fig. 6 *a*, c. $\frac{21}{1}$. Fragment de la même partie dans un grain complètement développé (Fig. 7 *g*), coupe transversale; les lettres comme dans la Fig. 6; *h* apparaît seulement comme une raie étroite.

Fig. 7 *a-g*, c. $\frac{4}{1}$. Coupes transversales passant par le milieu d'un grain dans diverses phases de son développement.

Fig. 8, c. $\frac{360}{1}$. Réseau protéique d'une cellule amylifère dans les parties centrales de l'endosperme. Fragment.

Sur un apparail à température constante.

Par

L. Knudsen.

Lorsqu'en chauffant avec du gaz, on veut maintenir une température très constante, il ne suffit pas d'employer un thermo-régulateur. Dans tous les apparails de ce genre, qui, en principe, sont construits comme le thermo-régulateur de M. Reichert (voir Fresenius, Zeitschr. f. an. Chemie 1872, p. 35), où un liquide ou un gaz, par son changement de volume, règle l'écoulement du gaz à la lampe soit directement, soit indirectement en agissant sur une colonne de mercure ou un corps solide, il arrive en effet toujours que, si, pendant la régulation, l'orifice d'arrivée est alternativement ouvert et fermé, l'allumage et l'extinction de la lampe ont lieu à une température plus élevée lorsque la pression du gaz est forte que lorsqu'elle est faible; et si, au lieu de fermer complètement l'orifice, on ne le ferme qu'en partie, la fermeture doit être plus complète à une haute qu'è une basse pression pour produire le même changement dans la grandeur de la flamme. On voit donc que la température réglée par le thermo-régulateur sera, dans tous les cas, d'autant plus élevée que la pression du gaz sera elle-même plus grande. Le seul thermo-régulateur qui, sous ce rapport, soit indépendant de la pression, est celui construit par M. Scheibler (v. Fresenius, Zeitschr. f. an. Chemie 1868, p. 88), mais il est difficile de le maintenir longtemps en bon état. Il va sans dire que le changement ainsi produit dans la température par une pression variable, peut être rendu aussi petit qu'on voudra par l'emploi de thermo-régulateurs suffisamment grands, mais c'est ordinairement incommode et coûteux. Sous ce rapport, les régulateurs dont l'action est fondée sur la dilatation de substances gazeuses, et notamment ceux qui sont basés sur les variations de tension de vapeurs saturées avec la température, ont un grand avantage, comme ils n'ont pas besoin d'être bien grands pour annuler l'influence de la pression variable du gaz, mais ils ont tous le défaut d'être à un haut degré dépendants de la pression barométrique, d'où il suit qu'ils sont très peu

sûrs et ne peuvent jamais, pendant longtemps, maintenir une température constante.

Dans ce qui précède, il n'a été question que du gaz que reçoit la lampe par l'intermédiaire du thermo-régulateur. Mais il est en général nécessaire et, en tout cas, pratique d'employer en même temps une flamme de sûreté afin que, si le régulateur intercepte l'afflux du gaz, on soit sûr que la lampe se rallumera lorsque le gaz arrivera de nouveau. Même si cette flamme est rendue aussi petite que possible, elle sera cependant toujours influencée d'une manière différente selon que la pression du gaz variera, et empêchera en tout cas de régler bien exactement le thermo-régulateur (comp. la méthode de réglage décrite plus bas; on y emploie une flamme de sûreté aussi grande que possible, et c'est justement la principale cause pour laquelle les oscillations de la température deviennent si petites). Il va sans dire que ni le régulateur de M. Scheibler, ni les grands régulateurs construits d'après le principe de M. Reichert, ne peuvent remédier à l'erreur qui résulte des variations dans la grandeur de la flamme de sûreté.

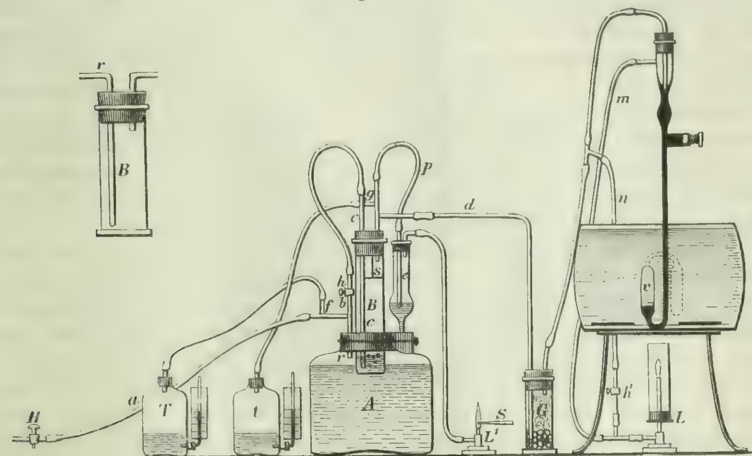
Comme exemple de l'influence qu'un changement dans la pression du gaz peut exercer sur la température à laquelle on règle un thermo-régulateur, nous citerons le suivant: un régulateur de Reichert de grandeur ordinaire, mais dont l'orifice latéral du tube d'arrivée du gaz était fermé (par conséquent sans flamme de sûreté), ayant été réglé à la température de 53 ^{0} C. et le gaz étant maintenu à une pression constante de $4^{\text{mm.}}$ d'eau, je constatai que la temperature oscillait entre 52,75 et 53,25 ^{0} C. Le pression du gaz était-elle ensuite portée à $15^{\text{mm.}}$ d'eau, sans qu'on touchât à la vis servant à régler le thermo-régulateur, la température variait entre 54,5 et 55,5 ^{0} C. Dans les deux cas, le gaz brûlait sans interruption. En chauffant davantage avec précaution à l'aide d'une autre lampe et en laissent ensuite refroidir lentement, on observait, dans le premier cas, que le régulateur éteignait la lampe lorsque la température avait atteint 54,5 ^{0} C.. et qu'elle se rallumait lorsque la température était tombée à 54 ^{0} C. Les températures correspondantes, dans le second cas, étaient: 55,75 ^{0} C. et 55,25 ^{0} C.

On voit donc que la pression du gaz a une influence très sensible et que, pour maintenir la température constante au moyen d'un thermo-régulateur, il est en même temps nécessaire de maintenir la pression du gaz invariable. On peut obtenir ce résultat à l'aide de l'appareil représenté Fig. 2.

Le principe de cet appareil est le suivant: le gaz étant amené par le tube r, sous une pression de $p^{\text{mm.}}$ d'eau, dans le vase B (Fig. 1) et de là à une lampe, la pression en B ($q^{\text{mm.}}$) sera moindre que p, et l'équilibre sera établi quand la quantité de gaz qui, dans un temps donné et avec une différence de pression $q^{\text{mm.}}$, peut s'écouler par le brûleur de la lampe sera égale à celle qui, dans le même temps et avec une différence de pression $(p-q)^{\text{mm.}}$ peut affleur par l'orifice du tube r. Si maintenaant la pression du gaz affluant divient $(p+a)^{\text{mm.}}$, et qu'on verse et même temps de l'eau dans B de manière que le tube r y plonge de $a^{\text{mm.}}$, quantité de gaz qui, dans l'unité de

temps, sort du tube r sera assez exactement déterminée par l'excès de pression à l'orifice de r, qui est $(p + a) - a = p^{mm.}$, par conséquent le même qu'auparavant, et la pression dans B sera donc aussi dans ce cas égale à $q^{mm.}$[1]). Le problème à résoudre est par suite

Fig. 1. Fig. 2.



de faire monter l'eau dans B d'autant de millim. que la pression du gaz croît. On y arrive de la manière suivante; le réservoir A (Fig. 2), qui est hermétiquement fermé et presque entièrement rempli d'huile, communique directement par r avec la conduite de gaz, et celui-ci est amené par b, qui est muni d'un robinet h, dans le tube B, auquel il convient de donner un diamètre de $3^1/_2$ centim. environ; après y avoir traversé une couche de liquide plus ou moins haute, le gaz se rend par d à la lampe. Le bocal cylindrique G, qui est rempli de coton non pressé, mais cependant arrangé de manière qu'il ne s'y trouve pas de grands canaux par lesquels le gaz puisse passer, ne sert qu'à retenir les gouttelettes d'huile entraînées par ce dernier. On peut, dans le même but, placer un écran s dans le tube B. Les

---

[1]) En prenant pour point de départ la formule de la vitesse théorique d'écoulement, le poids du gaz qui, dans l'unité de temps, s'écoule du tube r sera plus grand, même si la différence de pression ne varie pas, lorsque la pression du gaz est de $(p + a)^{mm.}$ que lorsqu'elle est de $p^{mm.}$, les poids étant proportionnels aux racines carrées des densités aux pressions $(p + a)^{mm.}$ et $p^{mm.}$ Mais celles-ci sont à peu près égales, de sorte que même en tenant compte de la différence, la pression $q^{mm.}$ en B n'en recevra qu'un très petit accroissement. J'ai aussi trouvé que l'augmentation de q par un fort accroissement de p n'est accusée par les indicateurs de pression que lorsque la différence entre p et q est relativement petite.

tubes *a*. *r* et la partie de *d* qui est comprise entre *B* et *G* doivent avoir un calibre d'au moins 6$^{mm.}$, les premiers pour que les variations dans la pression du gaz puissent rapidement réagir sur la pression en *A*, le dernier pour que les gouttelettes d'huile entraînées n'obstruent pas les tubes. Le diamètre de *A* étant grand par rapport à celui de *B*, une augmentation de $a^{mm.}$ dans la pression du gaz fera, à très peu de chose près, monter le liquide dans *B* de la même quantité, ce qui est dû à la circonstance qui la pression en *A* croît pour ainsi dire instantanément avec celle du gaz, tandis que la pression en *B* ne peut, en comparaison, croître que lentement à cause de l'écoulement de gaz qui a lieu par la lampe. Par suite de ce changement dans la hauteur du liquide, qui survient pour ainsi dire en même temps que le changement dans la pression, une augmentation dans la pression du gaz affluant n'aura, d'après ce qui précède, aucune influence sur celle du gaz qui quitte le régulateur.

Met-on le régulateur en communication avec une lampe qui doit brûler sous une pression constante, le réglage se fait comme il suit: la pression désirée est-elle de 5$^{mm.}$, tandis que la pression minimum que pourra prendre le gaz dans la conduite est de 10$^{mm.}$, par ex., on diminue celle-ci par l'intercalaton (à l'aide de tubes en *T*) d'une ou de plusieurs lampes entre le robinet du gaz *H* et le régulateur, et en réglant ce robinet de manière que le gaz qui se rend au régulateur ait une pression de 10$^{mm.}$ Puis on règle le robinet *h* jusqu'a ce que la pression du gaz qui sort du régulateur soit de 5$^{mm.}$, en veillant toujours à ce que celle du gaz qui y entre ne varie pas, et il suffit pour cela de régler de nouveau au besoin le robinet *H*. A-t-on ainsi obtenu que la pression du gaz qui va au régulateur soit de 10$^{mm.}$ et celle du gaz qui le quitte, de 5$^{mm.}$, on porte la première pression à 25$^{mm.}$, par ex., et plonge le tube *c*[1]) dans l'huile d'une quantité plus ou moins grande, jusqu'à ce que le gaz sortant ait de nouveau une pression de 5$^{mm.}$[2]). L'appareil est alors réglé, et la pression du gaz arrivant au régulateur peut varier au delà de 10$^{mm.}$ sans que celle du gaz qui alimente la lampe en soit affectée. Les pressions sont mesurées par les indicateurs de pression *T* et *t*, qui sont en communication avec les tubes *f* et *g*, lesquels sont fermés avec des tubes en caoutchouc et des pinces à ressort quand l'apparail est réglé.

J'ai d'abord mis de l'eau dans la régulateur, mais elle s'évapore et il en résulte bientôt une augmentation dans la pression du gaz sortant. L'huile d'olive, par la'quelle je l'ai remplacée, ne présente pas cet inconvénient et permet de maintenir pour ainsi dire indéfiniment la pression constante.

---

[1]) Ce tube est à son extrémité inférieure coupé obliquement sous un angle de 45° env.

[2]) On doit de préférence boucher *B* avec un bouchon en liège luté avec de la cire ou le la laque. En lubréfiant avec de l'huile le trou par lequel passe le tube *c*, il est facile de relever ou d'enfoncer ce tube, même après un long repos. On procède de même pour le tube *e* dans la „soupape" (voir plus bas).

Comme exemples de la manière dont le régulateur fonctionne, je citerai les suivants. Dans chacun d'eux sont indiquées la pression minimum, prise comme point de départ, du gaz arrivant au régulateur, et la pression constante à laquelle l'apparail a été réglé. T et t désignent respectivement les pressions du gaz qui va au régulateur et qui en sort, et les nombres entre paranthèses, les pressions qu'on aurait si l'on empêchait le régulateur de fonctionner en retirant de l'huile le tube c.

I. Le régulateur était mis en communication avec une lampe ordinaire de Bunsen.

Ex. 1. Pression minimum: $5^{mm.}$; pression constante: $2^{mm.}$
$T = 5^{mm.} - 16^{mm.} - 35^{mm.} (35^{mm.}) - 40^{mm.} (40^{mm.})$
$t = 2^{mm.} - 2^{mm.} - 2^{mm.} (10^{mm.}) - 2^{mm.} (12^{mm.})$

Ex. 2. Pression minimum: $10^{mm.}$; pression constante: $5^{mm.}$
$T = 10^{mm.} - 35^{mm.} (35^{mm.}) - 44^{mm.}$
$t = 5^{mm.} - 5^{mm.} (12^{mm.}) - 5^{mm.}$

Ex. 3. Pression minimum: $10^{mm.}$; pression constaute: $7^{mm.}$
$T = 10^{mm.} - 27^{mm.} - 35^{mm.} - 45^{mm.} (45^{mm.})$
$t = 7^{mm.} - 7\frac{1}{2}^{mm.} - 8^{mm.} - 8\frac{1}{2}^{mm.} (25^{mm.})$

Ex. 4. Pression minimum: $10^{mm.}$; pression constante: $2^{mm.}$
$T = 10^{mm.} - 30^{mm.} - 35^{mm.} (35^{mm.})$
$t = 2^{mm.} - 2^{mm.} - 2^{mm.} (5^{mm.})$

Ex. 5. Pression minium: $15^{mm.}$; pression constante: $10^{mm.}$
$T = 15^{mm.} - 30^{mm.} - 36^{mm.} (36^{mm.}) - 46^{mm.} (46^{mm.})$
$t = 10^{mm.} - 10^{mm.} - 10^{mm.} (22^{mm.}) - 10^{mm.} (28^{mm.})$

II. Le régulateur était mis en communication avec 3 lampes de Bunsen, dont l'une avec un brûleur à très large ouverture[1]).

Ex. 1. Pression minimum: $10^{mm.}$; pression constante: $2^{mm.}$
$T = 10^{mm.} - 30^{mm.} (30^{mm.}) - 40^{mm.}$
$t = 2^{mm.} - 2^{mm.} (5^{mm.}) - 2^{mm.}$

Ex. 2. Pression minimum: $10^{mm.}$; pression constante: $5^{mm.}$
$T = 10^{mm.} - 35^{mm.} (35^{mm.})$
$t = 5^{mm.} - 5^{mm.} (12^{mm.})$

Ex. 3. Pression minimum: $10^{mm.}$; pression constante: $7^{mm.}$
$T = 10^{mm.} - 30^{mm.} (30^{mm.})$
$t = 7^{mm.} - 7^{mm.} (18^{mm.})$

Ex. 4. Pression minimum: $15^{mm.}$; pression constante: $10^{mm.}$
$T = 15^{mm.} - 32^{mm.} (32^{mm.}) - 38^{mm.}$
$t = 10^{mm.} - 10^{mm.} (20^{mm.}) - 10^{mm.}$

Le régulateur ne peut, à cause de la faible fluidité de l'huile, arrêter les oscillations instantanées dans la pression du gaz. Mais elles n'exercent aucune influence lorsque le régulateur doit être employé pour obtenir une température constante, comme il est à supposer qu'elles s'annulent mutuellement.

---

[1]) Il va sans dire que le nombre des lampes que le régulateur a à alimenter avec du gaz à pression constante doit se régler d'après le diamètre des canaux par lesquels le gaz devra passer.

Si l'on rétrécit ou ferme la conduite *d* par laquelle passe le gaz qui sort du régulateur, la pression augmentera peu à peu jusqu'à devenir, dans le dernier cas, égale à celle du gaz affluant. C'est donc ce qui aura lieu lorsque, entre le régulateur de pression et la lampe, on intercalera un thermo-regulateur, et que ce dernier interceptera en partie ou en totalité le courant de gaz qui alimente la lampe. Le régulateur de pression cessera alors de fonctionner, et si l'occlusion est complète, la pression du gaz qui arrive au thermo-régulateur deviendra égale à la pression variable qui règne dans la conduite. Pour l'empêcher, on établit une „soupape“ qui permet au gaz de se rendre par le tube *e* à la lampe L^1, en même temps qu'il va par *d* à la lampe *L*. Le tube *e*, dont l'extrémité inférieure est coupée obliquement sous un angle de 45 ⁰ environ, plonge dans l'huile à une profondeur variable suivant la pression constante qu'on veut avoir pour le gaz qui alimente la lampe *L*. La flamme de sûreté *S* sert à allumer le gaz qui doit passer par la soupape. Si, dans ces circonstances, l'ouverture qui, dans le thermo-régulateur, livre passage au gaz est rétrécie ou fermée, le gaz s'échappera par la lampe L^1 sans que le régulateur de pression cesse de fonctionner, et par conséquent sans que la pression du gaz qui se rend ou thermo-régulateur augmente. En procédant ainsi on perd, il est vrai, une certaine quantité de gaz, mais si la pression constante choisie n'est pas plus haute qu'il n'est nécessaire, et que la température environnante ne varie pas trop, elle est toujours très faible (voir plus bas). Comme la lampe L^1 s'éteint et se rallume constamment, il est bon, comme l'indique la Fig. 2, d'en enlever le tuyau pour empêcher que la flamme n'y descende. Afin de faciliter autant que possible le passage du gaz par la soupape, il faut donner une grande ouverture au bec de L^1 et la nettoyer à quelques jours d'intervalle.

J'ai employé comme thermo-régulateur un apparail de la forme représentée Fig. 2. C'est dans ces parties essentielles un régulateur de Reichert, seulement avec la différence que le liquide qui, par son changement de volume, détermine la régulation est de l'alcool, dout le réservoir *v* est presque rempli. Le coefficient de dilatation de l'alcool étant bien plus grand que celui du mercure, un pareil régulateur, toutes choses égales d'ailleurs, sera bien plus sensible qu'un régulateur ordinaire de Reichert, mais on ne peut lui donner la forme que celui-ci a en général, à savoir telle qu'il puisse être installé dans un bouchon et même dans des ouvertures très étroites; ici l'ouverture doit être plus grande et le bouchon, s'il en faut un, coupé en deux. Au lieu d'un seul réservoir, il est préférable d'en employer deux (comme on l'a indiqué dans la Fig. 2 par des lignes ponctuées) d'un plus petit diamètre, car on obtient ainsi que le régulateur, sans être moins sensible, suit plus facilement les variations de la température environnante. Si cette forme de la régulateur doit être employée à de hautes températures, on peut remplacer l'alcool du réservoir par de l'aniline[1]). La lampe *L* est alimentée en partie par le thermo-

[1]) Ces régulateurs sont construits par M. Jacob, fabricant d'instruments en verre, à Copenhague Le remplissage doit se faire sur place,

régulateur, en partie par le tube *n*, qui est muni du robinet h^1, ce qui l'empêche de s'éteindre complètement. La flamme de cette lampe doit être protégée contre les courants d'air par un verre suffisamment large, qu'on place sur le tuyau à l'aide d'un bouchon muni d'ouvertures assez grandes pour le passage de l'air. Afin d'empêcher la flamme de la lampe de descendre dans le tuyau, il convient de mettre dans ce dernier un petit morceau de toile métallique en laiton, qu'on y introduit à l'aide d'une baguette. Pour plus de sûreté, on peut aussi, lorsque la flamme est très petite, fermer les ouvertures inférieures du tuyau de la lampe, ou bien encore employer une lampe comme L^1 sans tuyau. Lorsque la pression du gaz est faible, il peut être nécessaire, si l'on veut avoir une flamme suffisamment grande, d'élargir l'ouverture du bec de la lampe.

Pour régler le thermo-régulateur, après qu'il a été mis en communication avec le régulateur de pression, on opère comme il suit: après avoir fermé le tube en caoutchouc *m* avec une pince á ressort, de sorte que la lampe n'est plus alimentée que par le robinet h^1, qui est tout ouvert, on ferme de la même manière le tube en caoutchouc *p* et règle le régulateur de pression à la pression qu'on juge nécessaire, mais que doit être un peu inférieure à la pression minimum du gaz. On rétablit énsuite la passage du gaz par *p* et, en fermant avec les doigts le tube *n*, enfonce le tube *p* dans l'huile aussi profondément que cela peut ce faire sans augmenter par là la pression du gaz sortant. Puis, le bain-marie est rempli d'eau à la température qu'on désire de maintenir, et lorsque, en réglant le robinet h^1 et peut-être en rapprochant ou en éloignant en même temps la lampe du bain-marie, on a obtenu que la quantité de gaz que la lampe reçoit par cette voie, même à la température la plus élevée du local, ne peut maintenir celle de l'eau, mais ne lui permet cependant que de tomber très lentement — et plus lentement elle tombe, mieux cela vaut — on ouvre le tube *m* et règle de nouveau le régulateur de pression à la pression constante qui répond à l'ouverture plus grande donnée ainsi à l'écoulement du gaz. Cela fait, on renouvelle en partie l'eau du bain-marie, jusqu'à ce que sa température dépasse celle à laquelle le régulateur doit être réglé d'au moins le même nombre de degréé dont on suppose que la température du local s'abaissera pendant la nuit, et a-t-on la certitude que la lampe, qui maintenant est alimentée par *m* et *n*, pourra relever la température, on remplace une partie de l'eau chaude par de l'eau froide jusqu'à ce que le bain-marie ait la température demandée, après quoi on règle le thermo-régulateur. Si la lampe, lorsque le gaz lui arrive à la fois par *m* et par *n*, ne peut fournir la chaleur nécessaire, il faudra élargir l'ouverture de son brûleur et peut-être remplacer le tube qui amène la gaz au thermo-régulateur par un tube d'un plus grand calibre, mais pas plus grand qu'il n'est nécessaire afin d'éviter

mais ne présente aucune difficulté. Quant aux tubes d'arrivée du gaz on peut facilement les fabriquer soi-même, et il est bon d'en avoir de plusieurs calibres. On en coupe l'extrémité un peu obliquement avec une lime humectée d'huile de thérébenthine.

toute perte inutile de gaz. Pour que la soupape fonctionne d'une manière satisfaisante, il faut que le diamètre du tube *e* soit au moins égal à celui de l'orifice d'arrivée du gaz dans le thermo-régulateur, ou, s'il y en a plusieurs communiquant avec le même régulateur de pression, au moins à la somme de ces orifices. Le dinmètre du tube *e* ne peut guère cependant avoir moins de 4 millim.

Lorsque, au bout de 8 jours environ, le mercure du thermo-régulateur s'est terni à la surface, la température du bain-marie s'élève un peu (dans la régulateur dont je me suis servi, de $^1/_{40}$ ° C.) et, si on le laisse en repos, elle augmente encore davantage. Il est facile, dès qu'on la remarque, de remédier à cette élévation de température, car il suffit de desserrer et puis de serrer de nouveau la vis avec laquelle on règle l'appareil, pour que le mercure descende dans la partie évasée du tube et remonte aussitôt. La même régulation s'obtient facilement en observant la grandeur de la flamme avant et après qu'on a tourné la vis. Si on le fait pendant que le régulateur intercepte en partie ou en totalité l'arrivée du gaz, il vaut mieux, pour éviter un trop fort échauffement, de fermer tout à fait avec les doigt le tube *m*. Il est indispensable que les tubes en caoutchouc qu'on emploie, même ceux en caoutchouc noir, soient bien nettoyés intérieurement.

Dans une expérience, le bain-marie employé avait un diamètre de 22 centim. et une hauteur de 16$^{cm.}$; à 1$^{cm.}$ du fond était établi un double fond de 18$^{cm.}$ de diamètre et percé en son milieu d'une ouverture de 4$^{cm.}$ Il était rempli d'eau jusqu'à 1$^{cm.}$ du bord. Le réservoir du thermo-régulateur avait une longueur de 9$^{cm.}$ sur 16$^{cm.}$ d'épaisseur. L'eau était couverte d'une mince couche d'huile, mais le bain-marie n'était d'ailleurs nullement isolé. La température se mesurait en partie à l'aide d'un thermomètre fixe disposé de manière que son réservoir se trouvait à mi-hauteur du régulateur, en partie avec d'autres thermomètres mobiles au préalable exactement comparés avec le précédent. Tous les thermomètres indiquaient $^1/_{10}$ ° C. et chaque division correspondante était de 1$^{mm.}$ environ. Le thermo-régulateur était réglé à 45,5 ° C. La température se maintint pendant un mois si constante qu'elle varia au plus de $^1/_{10}$ ° C., et on constata avec les thermomètres mobiles que la température des points les plus différents du bain-marie ne s'écartait que de $^1/_{20}$ ° C. environ de celle marquée par le thermomètre central. Dans une autre expériencs où la température constante était de 36 ° C.[1]), mais où l'eau n'était pas couverte d'une couche d'huile, on obtint dans le bain-marie une température tout aussi uniforme et aussi constante en maintenant le

[1]) D'après ce qui a été dit plus haut du réglage, la flamme de sûreté ne peut, dans ce cas, à la pression constante choisie pour le gaz (5$^{mm.}$), maintenir à 36 ° C. la température du bain-marie. Mais ferme-t-on *m* et porte-t-on à 10$^{mm.}$ la pression du gaz, la flamme de sûreté fait, au bout de 2 h. environ, remonter la température à 44 ° C. On voit donc que la pression du gaz, en changeant la grandeur de la flamme de sûreté, peut avoir une grande influence sur la température.

niveau constant à l'aide d'une bouteille de Mariotte, apparail qu'il est bon également d'employer, même lorsque l'eau est couverte d'une couche d'huile. Pendant ces expériences, la pression du gaz variait dans les 24 heures de c. 12mm. à c. 55mm. d'eau, et la température du local, entre c. 12 ° C. et 22 ° C. La pression minimum du gaz allant au régulateur de pression était de 10mm. d'eau, et la pression constante du gaz qui en sortait, de 5mm. Dans une expérience où 3 de ces thermostats étaient alimentés à la fois de gaz à la pression de 5mm. par le même de régulateur de pression, et où les températures constantes étaient comprises entre c. 35 ° et c. 50 ° C., la quantité de gaz qui, dans les 24 heures, s'écoulait par la lampe L^1 s'élevait au plus à 300 déc. cubes.

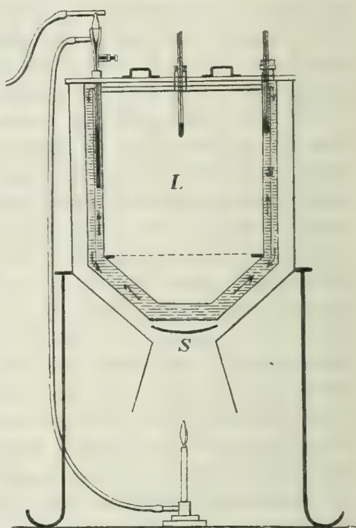
Si l'on met plusieurs bains-marie en communication avec la même bouteille de Mariotte, il faut que chacun d'eux, pendant qu'on le règle, soit isolé par une pince à ressort de cette bouteille et des autres bains-marie, comme autrement il passerait de l'eau d'un bain-marie dans un autre par suite du changement de niveau résultant du réglage, ce qui troublerait ce dernier ainsi que la température des autres bains-marie. Il va sans dire que le niveau de l'eau dans le bain-marie doit, après le réglage, être celui qui est maintenu par la bouteille de Mariotte. Si un objet doit être introduit dans le bain-marie, on oura soin de le chauffer au préalable à une température voisine de celle du bain et d'enlever l'eau déplacée pour que le niveau du bain reste invariable. Réciproquement, si un objet plongé dans le bain-marie doit en être retiré, on isolera provisoirement ce dernier de la bouteille de Mariotte, et ne le remettra en communication avec elle qu'après y avoir ajouté de l'eau à la même température, jusqu'à ce que le niveau maintenu par la bouteille de Mariotte soit rétabli. Lorsqu'on opère comme il vient d'être dit, il ne survient aucun trouble dans la marche du thermostat. Plus celui-ci est grand, moins il est nécessaire d'observer toutes ces précautions et plus il est facile de régler la flamme.

Je n'ai pas eu l'occasion de rechercher si le régulateur de pression en communication avec le thermo-régulateur peut, par un réglage exact, maintenir la température tout aussi constante lorsque celle-ci dépasse 50 ° C. environ, mais il n'y a aucune raison d'en douter si l'on emploie une isolation suffisante.

Je n'ai pas non plus examiné comment les choses se passent dans un bain d'air. Il est certain que l'introduction de nouveaux objets, toutes choses égales d'ailleurs, en troublera plus la température que celle d'un bain-marie. La température environnante exercera également une plus grande influence, de sorte qu'il sera certainement toujours nécessaire de recourir à l'isolation. Une forme pratique d'un pareil bain d'air, forme qui n'est qu'une modification du thermostat de M. Horstmann (Annalen der Oenologie, Bd. III, p. 4). est représentée dans ses parties essentielles Fig. 3. L est la masse d'air dont la température doit être maintenue constante; elle est entourrée en bas et sur les côtés d'un matelas d'eau. La forme qu'a celui-ci à sa partie inférieure a pour but de faciliter la circulation de l'eau, que les écrans s forcent à suivre la direction indiquée par les flèches, ce qui

permet à la couche d'eau extérieure d'agir en même temps comme isolant. L'isolation se fait du reste seulement à l'aide de l'air. Pour que l'eau puisse circuler facilement, le diamètre de la couche d'eau ne doit pas être trop petit; une épaisseur de c. 4 centim. remplira bien le but. Il convient de prendre un thermostat cylindrique afin que les parois puissent mieux résister à la pression de l'eau. Les fonds doivent être reliés entre eux par des cornières de tôle, et il est bon d'en mettre aussi entre les parois cylindriques, mais de manière à gêner aussi peu que possible la circulation de l'eau. La choue d'eatu extérieure agissant comme isolan, il suffit d'avoir dans le bas et sur les côtés un matelas d'air de c. 2cm. d'épaisseur. Par contre, il convient d'employer dans le couvercle 2—3 couches d'air, chacune de ½cm. — 1cm. d'épaisseur. L'écran *S* est en tôle assez épaisse, et sert seulement à protéger le fond contre l'action directe de la flamme. La tôle plombée et peinte au minium pour mieux résister à l'action nuisible des produits de la combustion du gaz, constitue pour un pareil bain d'air une matière première à la fois pratique et bon marché. Le laboratoire de Carlsberg possède un grand exemplaire d'un bain d'air de ce genre, qui, avec un régulateur ordinaire de Reichert, maintient la température très constante.

Fig. 3.



Au lieu des tubes en *T* compliqués représentés Fig. 2, on peut, cela va sans dire, employer des tubes en *T* ordinaires réunis avec des tubes en caoutchouc. L'appareil peut ainsi être construit avec ce qu'on trouve dans chaque laboratoire.

Le défaut que présente le régulateur de pression, à savoir qu'il doit diminuer la pression pour pouvoir la régler, est commun à tous les appareils de ce genre jusqu'ici connus. Mais si les ouvertures dés brûleurs sont seulemeat assez grandes, on peut en général travailler tout aussi bien avec du gaz à faible qu'à forte pression.

Un autre défaut, c'est que le réglage du régulateur de pression doit varier suivant la grandeur de l'ouverture du brûleur. C'est pourquoi, s'il est déjà en communication avec un thermo-régulateur qui fonctionne, on ne peut le faire communiquer avec un second à moins de le régler de nouveau, ce qui se fait comme il a été dit plus haut (il n'y a toutefois rien à changer à la soupape), en choisissant pour le réglage le moment où l'orifice d'arrivée du gaz dans le premier thermo-régulateur est à son maximum.

JUSQUÁ QUELLE LIMITE PEUT-ON, PAR LA MÉTHODE DE M. HANSEN, CONSTATER UNE INFECTION DE »LEVÛRE SAUVAGE« DANS UNE MASSE DE LEVÛRE BASSE DE SACCHAROMYCES CEREVISIÆ?

PAR

JUST CHR. HOLM ET S. V. POULSEN.

Les recherces de M. le Dr. Hansen sur les maladies de la bière causées par des levûres alcooliques (Résumé du compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg II Vol. 2 Liv., 1883, p. 52, et Zeitschrift für das ges. Brauwesen, München, 1884, p 273) montrent combien grande est l'influence qu'une infection de »levûre sauvage« peut avoir.

Il est donc de la plus grande importance de pouvoir constater la présence d'un pareil mélange, et, pour y arriver, la formation des ascospores chez les cellules de levûre est, pour le moment. le seul moyen analytique dont on dispose.

En nous référant au mémoire de M. Hansen (Résumé etc. II Vol. 2e Liv. p. 13 et suiv.), nous rappellerons seulement ici que c'est en partie l'époque différente où les diverses espèces développent leurs ascospores à une certaine température, et en partie les températures maximum et minimum applicables à chaque espèce, dont dépend l'emploi analytique de la production des ascospores (voir aussi le mémoire du même auteur I Vol. 4 Liv. 1882, p. 204—206, Note [2])). M. Hansen nous a en outre, tant à nous qu'à ses autres élèves au laboratoire, souvent donné des renseignements verbaux sur cette question, et c'est principalement sur eux que nous avons établi le plan des expériences qui suivent.

La sensibilité, dans toute méthode analytique, est un point toujours très important et souvent décisif; il s'agissait donc, dans ce cas, de déterminer la quantité minimum de »levûre sauvage«, dont on peut constater la présence dans la levûre basse de brasseries.

Les cultures pour faire développer des ascospores par les cellules de levûre ont été practiquées à l'aide de blocs de plâtre et avec des cellules jeunes et vigoureuses (voir le mémoire cité, II Vol. 2 Liv. p. 30).

On a employé dans ces essais comme levûre principale de la levûre basse du S. cerevisiæ (la levûre pure no 1 de la brasserie), l'espèce sur laquelle est basée l'exploitation de la brasserie de vieux Carlsberg et d'un grand nombre d'autres, notamment dans les pays scandinaves, et, comme levûres de mélange, les levûres sauvages suivantes:

S. Pastorianus I.
S. Pastorianus III.
S. ellipsoïdeus II.

qui sont décrites dans le dernier mémoire cité p. 31 et suiv.

On s'est exclusivement servi de cultures pures de ces 4 formes. Le choix des levûres sauvages sus-nommées a été déterminé par la raison que, d'après les recherches de M. Hansen, elles provoquent des maladies dans la bière (trouble de la levûre, goût amer), et comme elles sont les seules chez qui ce fait ait été constaté, il n'y avait aucun motif pour en essayer d'autres. A 25 ⁰ C., elles produisent des ascospores déjà au bout de 25—28 heures, tandis que la levûre nº 1 de la brasserie, à la même température, n'en développe qu'un très petit nombre au bout de 5 jours, ou, le plus souvent, pas du tout. La différence est donc considérable. — Si toutes les cellules, dans une culture sur le plâtre, donnaient des ascospores, nos recherches seraient superflues, tout étant alors déjà indiqué à l'avance dans les mémoires de M. Hansen; mais ce n'est pas le cas, car il y en a toujours un certain nombre qui, dans ces conditions, ne développent pas d'ascospores; à combien s'élève ce nombre, c'est ce qu'on n'a pas encore cherché à déterminer.

La levûre a été cultivée dans des ballons Pasteur (de $^1/_2$ à $^1/_8$ de litre) à demi remplis de moût de bière houblonné stérilisé (env. 14 $^0/_0$ Ball.); les grands ballons ont donné 5 c. c. env., et les petits, 2—3 c. c. env. de levûre assez épaisse.

Après avoir obtenu, par une culture de 24 heures à 25 ⁰ C. dans ces ballons Pasteur, des cellules jeunes et vigoureuses, on décantait presque toute la bière et secouait dans le reste la levûre de dépôt. Celle-ci était ensuite versée dans des bocaux stérilisés. On avait soin que la levûre provenant des différentes espèces eût, autant que possible, la même concentration. A l'aide de pipettes stérilisées, qui à leur extrémité supérieure, étaient munies d'un bouchon en ouate stérilisé, on mesurait ensuite la quantité jugée convenable. S'agissait-il, par ex., d'un mélange contenant 5 $^0/_0$ de »levûre sauvage«, on prenait 10 c. c. de S. cerevisiæ et $^1/_2$ c. c. de »levûre sauvage«, et, pour un mélange avec 1 $^0/_0$ de cette levûre, 10 c. c. de S. cerevisiæ et $^1/_{10}$ de c. c. »levûre sauvage« soit 2 gouttes avec la pipette dont nous nous servions, etc. Les mélanges étaient versés dans un bocal stérilisé, et on les remuait avec soin avant de les semer sur les blocs de plâtre.

Il serait trop long et en même temps inutile de mentionner tous les essais auxquels nous nous sommes livrés, comme nous avons toujours opéré de la même manière, en ne faisant varier que la proportion de la levûre sauvage. Nous avons commencé avec un mélange de 10 $^0/_0$ de

levûre sauvage. De chaque mélange nous faisions 2 cultures sur des blocs de plâtre (6 en tout), après quoi pour plus de sûreté, nous semions sur 2 autres blocs un mélange de S. cerevisiæ et des 3 espèces de levûres sauvages. Enfin, comme contrôle, nous procédions en même temps sur des blocs de plâtre à des cultures des 4 espèces en question, chacune pour soi. Les 12 blocs étaient placés dans un thermostat à 25 ° C. et examinés au bout de 40 heures. Le résultat a toujours été que les blocs ensemencés de levûres sauvages pures renfermaient un très grand nombre d'ascospores, que les 8 blocs avec un mélange à 10 % en contenaient encore beaucoup, mais qu'il n'y en avait pas un seul sur les blocs où l'on avait semé des cultures pures de S. cerevisiæ. Dans des essais, comme dans tous les autres, le contrôle ci-dessus mentionné a toujours pleinement confirmé que les ascospores observés ne provenaient pas du S. cerevisiæ, mais des levûres sauvages.

Nous avons entrepris une série d'essais semblables avec des mélanges à 5 %, 3 %, 2 % et 1 %, où, dans les deux derniers cas, la levûre sauvage ne formait donc respectivement que $^1/_{50}$ et $^1/_{100}$ de la masse, et, au bout de 48 h. env., on pouvait sans difficulté constater la présence de cellules avec des ascospores. Nous nous sommes efforcés de rendre la concentration des différentes espèces aussi égale que possible; cependant la levûre provenant des espèces sauvages était souvent plus fluide que celle produite par le S. cerevisiæ, ce qui veut dire que le mélange a plutôt été au-dessous qu'au-dessus de celui qui est indiqué dans chaque cas; la méthode est donc sans doute encore plus sensible qu'il n'est dit ici.

Il a en outre été fait un essai (8 blocs de plâtre) avec un mélange à $^1/_2$ %, où par conséquent $^1/_{200}$ de la masse était de la levûre sauvage, et nous avons également, au bout de 44 heures, pu trouver quelques cellules avec des ascospores dans toutes les cultures renfermant des levûres sauvages; seulement, pour deux d'entre celles, il a été nécessaire de prendre plusieurs échantillons avant d'y découvrir des cellules à ascospores. L'essai a été refait avec le même résultat.

On pourrait naturellement obtenir un résultat analogue avec un mélange encore plus faible, et trouver une ou un tout petit nombre de cellules à ascospores, en prenant beaucoup d'échantillons de chaque culture et en examinant chacun d'eux avec soin; mais comme cela n'a aucune importance practique, nous n'avons pas poussé nos essais plus loin.

Ce doit aussi être considéré comme un résultat satisfaisant pour l'emploi pratique de la méthode d'avoir pu constater la présence d'un mélange de levûre sauvage aussi faible que $^1/_{200}$ de la masse totale. Il nous suffira, à cet égard, de nous référer au mémoire cité plus haut de M. Hansen sur les maladies provoquées dans la bière par des ferments alcooliqnes, où il est dit que, lorsque le S Pastorianus III ou le S ellipsoïdeus II ne constitue que $^1/_{41}$ de la levûre de la mise en levain, et que la fermentation et l'enmagasinage de la bière se font d'après les procédés généralement en usage dans les bonnes brasseries, la maladie qu'ils occasionnent (trouble de la levûre) par leur présence en plus grande quantité ne se déclare pas. Pour les espèces dont il s'agit, il est donc plus que suffisant de pouvoir indiquer un mélange à $^1/_{200}$.

La rapidité avec laquelle on peut obtenir le résultat n'est pas non plus sans intérêt pour la pratique de l'analyse. Les essais faits dans ce but avec des mélanges à 2 et à 1 %, ont montré qu'on peut déjà après 30 heures trouver des cellules isolées avec des ascospores, mais que ce n'est cependant qu'au bout de 40 heures qu'elles apparaissent en assez grande quantité. Il vaudra donc mieux attendre jusque là pour faire l'analyse.

La formation des ascospores peut aussi, cela va sans dire, être employée pour reconnaître si des levûres autres que celle dont nous nous sommes occupés dans ce travail sont infectées ou non par des levûres de maladie. Mais on ne pourra pas, dans tous les cas, opérer à la même température, et il faudra par conséquent entreprendre une nouvelle série d'expériences avant de pouvoir donner, dans tous ses détails, la règle à suivre. Nous nous réservons de traiter cette question dans une communication ultérieure.

RECHERCHES SUR LA PHYSIOLOGIE ET LA MORPHOLOGIE DES FERMENTS ALCOOLIQUES.

PAR

EMIL CHR. HANSEN.

V.

MÉTHODES POUR OBTENIR DES CULTURES PURES DE SACCHAROMYCES ET DE MIKROORGANISMES ANALOGUES.

Dans la Revue du laboratoire pour 1882 et 1883, j'ai publiés quelques renseignements sur les méthodes que j'avais successivement imaginées dans le cours des dernières années pour obtenir avec certitude des cultures pures de Saccharomyces. La manière d'opérer n'y étant indiquée qu'à grands traits, j'ai été, de plusieurs côtés et à différentes reprises, invité à donner un exposé circonstancié de tous les détails, un guide pour ceux auxquels ce genre de travaux n'est pas encore familier, et qui leur permit de les exécuter eux-mêmes avec assurance et avec assez de facilité[1]. Si je ne satisfais qu'aujord'hui à cette demande, c'est parce que d'autres travaux plus importants ont absorbé jusqu'ici tout mon temps, et que j'ai voulu, au préalable, vérifier tel ou tel point pour pouvoir offrir un guide aussi bon et aussi complet que possible.

D'après la nature du sujet, un pareil guide doit renfermer la description d'une foule de petits détails, mais comme c'est justement de ces détails que se compose l'ensemale, ils méritent toute attention.

[1] Je reçois aussi assez souvent des demandes de renseignements sur les appareils employés au laboratoire de Carlsberg pour mes expériences sur les fermentations. Ces appareils, en tant qu'ils sont en verre, se trouvent en général chez M. Jacob, 30 Gothersgade, à Copenhague.

Les communications qui suivent constituent une partie des cours de physiologie des fermentations que j'ai faits dans les dernières années au laboratoire pour des naturalistes étrangers.

En établissant une culture pure de tel ou tel microorganisme, nous nous proposons en général ou d'obtenir des renseignements sur son évolution et sa morphologie, ou de faire des expériences physiologiques. Dans le premier cas, ce sont des variations de croissance et de forme que nous désirons observer, recherche qui doit naturellement se faire à la table du microscope. Par l'observation directe. nous suivons, par ex.. la germination d'un spore de champignon et son développement ultérieur jusqu'à ce que la plante en provient ait elle-même produit des spores. Il est digne de remarque qu'il n'est pas besoin pour cela d'une culture en masse — un cherche même à l'éviter — et qu'une culture absolument pure n'est pas non plus nécessaire. Peu importe que quelques organismes étrangers soient présents, pourvu qu'ils ne gênent pas d'une manière sensible celui dont on veut étudier le développement, et que leur aspect diffère assez de celui de ce dernier, pour qu'aucune confusion ne puisse avoir lieu.

Il en est tout autrement de l'expérimentation physiologique; dans la plupart des cas, elle se fait loin de la table du microscope, en grande partie sans le contrôle de cet instrument, mais exige par cela seul des cultures absolument pures, le plus souvent conjointement avec une culture en masse. C'est seulement de cette espèce de cultures pures que nous allons nous occuper.

La voie par laquelle on pourra toujours obtenir une culture pure, quelles que soient les propriétés physiologiques et morphologiques du microorganisme à examiner, se présente d'elle-même; c'est l'ensemencement d'une seule cellule dans un liquide nourricier stérilisé à l'avance d'une manière telle, que des organismes étrangers ne puissent s'y glisser pendant la culture. Autant l'idée est simple, autant étaient grandes les difficultés qu'il a fallu surmonter avant que le problème pût être en quelque sorte regardé comme résolu. Plusieurs savants se sont de nos jours occupés de cette question, en s'appuyant les uns sur les autres. Dans les dernières années, on s'est surtout efforcé de rendre le travail plus facile et plus rapide, quelquefois aux dépens de la certitude.

Mes premières cultures pures ont été faites à l'aide d'une méthode de dilution. Les cellules étaient en effet additionnées d'un volume d'eau stérilisée d'une grandeur telle que 2 c. c. du mélange, lorsque les cellules

y étaient uniformément réparties, ne devaient renfermer qu'une cellule. Si l'on fait une série d'ensemencements, chacun de 1 c. c., il n'y en aura donc que de deux l'un qui devrait donner une cellule. C'est ainsi, par ex., que MM. Nägeli et Fitz ont préparé leurs cultures pures de bactéries. Mais la théorie montre déjà qu'on ne peut par ce moyen arriver à une complète certitude. La question est donc de savoir comment il sera possible de distinguer les ballons qui renferment plusieurs cellules de ceux qui n'en renferment qu'une. J'y suis parvenu à l'aide d'un caractère important fourni par le nombre des taches de levûre qui se forment dans les ballons. En effet si, dans un ballon renfermant un liquide nourricier, on introduit *n* cellules et qu'on le secoue pour répartir les cellules, celles-ci, le liquide une fois en repos, se logent au fond du ballon et y forment *n* taches, qui, après avoir atteint une certaine grandeur, peuvent facilement être observées et comptées à l'œil nu. Les ballons dans lesquels il ne s'est développé qu'une seule tache de levûre n'ont aussi reçu chacun qu'une seule cellule vivante. (Voir pour l'explication détaillée de la méthode mon mémoire de 1883, p. 25).

Telle était la nouvelle contribution que mes études avaient apportée sur ce point au développement de la méthode. On obtient par là une certitude plus grande qu'auparavant. Quant aux manipulations, il n'y a rien d'essentiel à ajouter à mes précédentes communications. (Voir le chapitre »Méthodes«, p. 23—26).

Un avantage important de cette méthode, c'est que, du moment qu'on a vraiment réussi à obtenir l'ensemencement d'une seule cellule dans un ballon renfermant un liquide nourricier, on a en même temps toutes les conditions pour faire une culture en grand sans avoir à craindre aucune infection venant du dehors. Mais la méthode est coûteuse, car elle exige un grand nombre de ballons; elle demande en outre plus de travail, plus d'expérience et plus de soin que n'en réclame la méthode décrite plus loin. Aussi n'est-elle employée maintenant que dans quelques cas. A-t-on affaire, par ex., avec un mélange de différentes espèces de levûres, dont quelques-unes sont vigoureuses et d'autres affaiblies, et veut-on précisément isoler ces dernières, il n'y aura en général pas d'autre moyen que d'y avoir de nouveau recours. De pareilles cellules ne se développent pas en effet ordinairement dans la gélatine nourricière (le substratum employé dans la méthode suivante), mais au contraire avec plus grande facilité dans des liquides. J'ai eu souvent l'occasion d'en faire l'expérience notamment dans les analyses de microorganismes vivant dans la terre.

Comme on sait, les cultures pures de bactéries, dans ces dernières années, se font en général d'après la méthode suivante de M. Koch; Quelques-unes des cellules qu'il s'agit de cultiver à l'état de pureté sont mises dans de la gélatine nourricière liquide, après quoi on secoue le tout pour les y répartir aussi également que possible. Le mélange est

versé sur une plaque de verre stérilisée, qui est ensuite placée dans une enceinte humide à une température convenable; les cellules qui sont emprisonnées dans la gélatine figée développent successivement des végétations. Mais il est évident qu'on n'a pas la certitude que chacune des végétations développées dans la gélatine n'est formée que par une seule cellule. Les différentes espèces de bactéries peuvent donner, il est vrai, des taches d'un aspect différent, ce qui facilite beaucoup l'emploi de la méthode. Mais cette ressource fait défaut chez les Saccharomyces; aussi faut-il procéder d'une autre manière pour en obtenir des cultures pures. Dans ce but, au lieu de verser la culture de gélatine sur une plaque ordinaire de verre, je la verse sur la face inférieure d'une lame de verre couvre-objet qui est ensuite fixée à une chambre humide (de Böttcher), et je m'assure à l'aide du microscope si les taches de végétation que j'emploie plus tard pour des cultures en grand proviennent réellement chacune d'une seule cellule.

C'est cette modification de la méthode de M. Koch qui est maintenant le plus fréquemment employée au laboratoire de Carlsberg, comme aussi dans les établissements du Danemark et de l'étranger qui, sur le modèle de Carlsberg, fabriquent pour l'industrie de la levûre pure provenant de races choisies, et s'occupent de l'étude des levûres. Pour la limite de la méthode, etc. voir mon mémoire de 1883, p. 26—29. Dans ce qui suit, on trouvera l'exposé détaillé que j'avais promis de tous les travaux que s'y rapportent, ainsi que la description des appareils employés.

1. Préparatifs: Comme pour les autres expériences de ce genre, il faut avoir soin, autant que possible, que l'air ne renferme pas de poussières ni, par conséquent, de germes: si la chose est faisable, on fermera à clef, quelque temps à l'avance, la pièce où doit se faire l'expérience, afin que l'air puisse s'y mettre en repos. On peut se procurer une petite chambre de travail où l'air est presque complètement dépouillé de germes, à l'aide d'une caisse qui est juste assez grande pour qu'on puisse y introduire les bras et les remuer avec une liberté suffisante; il faut en outre que la caisse soit bien éclairée du dehors, et qu'elle ait une porte glissant verticalement dans des coulisses et pouvant être maintenue à la hauteur voulue. On en lave partout l'intérieur avec de l'eau stérilisée, la laisse pendant quelque temps fermée dans la pièce où elle doit être employée et ouvre alors la porte avec précaution. L'exemplaire que possède le laboratoire a intérieurement une hauteur de 56, une largeur de 63 et une profondeur de 50 cm. La porte, de même que le plafond et les trois faces, sont de grandes glaces encastrées dans de solides cadres en bois, tandis que le fond est complètement en bois. La porte une fois abaissée, peut être fermée à clef. Dans plusieurs cas, il sera peut-être plus commode de se servir d'une caisse de dimensions plus petites. Mais les descriptions qui suivent supposent toujours qu'on opère dans une pièce ordinaire sans le secours de cet appareil.

On se sert des instruments et des appareils suivants: une paire de pinces, une dixaine de minces baguettes de verre, 2—3 chambres humides (de Böttcher) avec des anneaux de 30 millim. de diamètre, quelques

lames de verre eouvrc-objet appropriées, 2—3 morceaux de fil de platine de $1^1/_2$ cm. de long sur $^1/_2$ millim. d'épaisseur et quelques plaquet et cloches de verre. La Fig. 1 est, sur une échelle réduite, une coupe verticale de la chambre humide ci-dessus mentionnée: *a* est la lame de verre couvre-objet, sur la face inférieure *b* de laquelle se fait la culture; *c* est l'anneau de la chambre et *d*, une couche d'eau répandue sur le fond pour empêcher l'évaporation. Tous ces objets doivent être flambés à l'aide d'une flamme de gaz ou d'esprit de vin, ou mieux être enveloppés dans plusieurs couches de papier à filtrer et puis stérilisés dans un chauffoir (à 150 ^{0} C. pendant 2 heures). Avant de s'en servir, il faut naturellement les laisser suffisamment refroidir. Le bord libre de l'anneau des chambres humides est enduit de vaseline, et on verse sur le fond de celles-ci un peu d'eau stérilisée.[1]) Les fils de platine sont placés sur une petite plaque de verre stérilisée de manière à pouvoir être facilement saisis avec une des pinces, et recouverts d'une cloche en verre; on en fait autant pour les lames de verre couvre-objet et les chambres.

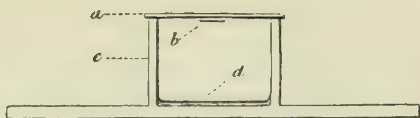
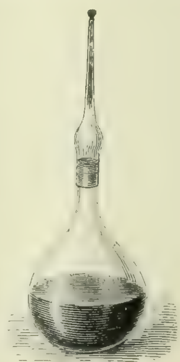


Fig. 1.

Un bain-marie chauffé à 30—35 ^{0} C. est tenu prêt ainsi qu'un support pour y maintenir les ballons Chamberland mentionnés ci-après. Il en faut deux (chacun de 30 c. c. env.) remplis à moitié d'eau stérilisée, et deux autres remplis à moitié de gélatine nourricière; on en flambe la surface et les laisse sous une cloche jusqu'à ce qu'ils doivent être employés. Comme le montre la Fig. 2, ils sont formés avec un capuchon à recouvrement à l'émeri et dont le tube mince est rempli de coton stérilisé. Quant à la gélatine, on se sert d'une solution à 5 $^0/_0$ dans du moût clair houblonné (14 $^0/_0$ Ball. env.). (Cette solution s'est aussi montrée d'un bon emploi dans les cas où l'on fait des ensemencements de ferments alcooliques qui ne peuvent pas faire fermenter la maltose, tels que le Sacch. apiculatus, le Sacch. exiguus et quelques espèces qui, pour la forme, ressemblent au Sacch. exiguus, mais ne développent pas d'endospores). Une proportion de gélatine inférieure à 5 $^0/_0$ n'est pas à conseiller; qu'on la prenne plutôt plus grande. Au lieu de moût, on peut aussi employer un liquide nourricier consistant en une solution de dextrose à 10 $^0/_0$, à laquelle on ajoute de l'eau de levûre jusqu'à ce que le liquide prenne une couleur jaune distincte. La gélatine


Fig. 2.

---

[1]) Pour fixer les anneaux à la lame porte-objet, je puis recommander une solution de gélatine dans l'acide acétique cristallisable (Acetum conc. pur.) à laquelle, avant de s'en servir, on ajoute du chromate jaune de potasse (ou bichromate de potasse) en poudre fine même que le colle (Glaslim) de M. Jensen, 20 Frederiksborggade à Copenhague.

dont il est parlé dans ce qui suit est toujours celle qui est préparée avec du moût de bière.

2. **Production de la culture pure:** Les ballons qui renferment la gélatine nourricière sont chauffés avec précaution jusqu'à ce que leur contenu devienne liquide, et portés ensuite au bain-marie. Comme point de départ pour la culture pure, il convient de prendre une végétation de cellules jeunes et vigoureuses. On en délaye un petit nombre dans un des ballons Chamberland à eau stérilisée jusqu'à ce que celle-ci devienne légèrement troublé, secoue ensuite le ballon pour y répartir les cellules aussi également que possible et, cela fait, y puise avec une baguette en verre quelques gouttes qui sont examinées au microscope. Pour cet examen microscopique comme pour ceux dont il sera question plus loin, je me sers d'un grossissement aussi faible que possible, c'est à-dire d'un objectif et d'un oculaire me permettant tout juste de distinguer clairement les cellules d'avec les autres petits corps qui les accompagnent. On obtient par là le champ de vision le plus grand possible et opère en même temps plus vite. Emploie-t-on un microscope de Zeiss, à Jéna, je recommende l'oculaire n° 1 et l'objectif DD, Le but de ce premier examen microscopique est d'apprécier la richesse du mélange en cellules. Après avoir de nouveau secoué suffisamment ce dernier, on y trempe un des fils de platine et le reporte rapidement dans un des ballons renfermant la gélatine liquide. Tant dans cet essai pour obtenir une égale répartition des cellules que dans les suivants, il faut éviter de former de l'écume. La température de la gélatine ne doit pas dépasser 35 ^{0} C.; il suffit qu'elle se maintienne liquide. L'examen microscopique a-t-il montré que le mélange aqueux est riche en cellules, on n'y trempe le fil de platine qu'à une petite profondeur, 2 millim., par ex.; dans le cas contraire, on l'enfonce davantage.

Après avoir secoué la gélatine infectée pour obtenir une égale répartition des cellules, on en prend quelques gouttes avec une baguette en verre pour les examiner au microscope. Pour plus de sûreté, il faut opérer sur deux échantillons; s'ils donnent chacun le même résultat, il y a lieu de supposer que les cellules sont également réparties et qu'on a obtenu des échantillons moyens. Il s'agit alors de déterminer si la gélatine a reçu ou non un nombre convenable de cellules: commet-on à cet égard une erreur grave, tout le travail ultérieur est fait en pure perte. Pour que la repartition des cellules dans la gélatine soit telle qu'on puisse avec certitude obtenir des cultures pures, il faut que les taches de végétation qui se forment plus tard aient une place suffisante, de manières qu'elles ne puissent se fusionner ou du moins que cela n'arrive pas souvent. C'est pourquoi on cherche par ce contrôle à être fixé sur la répartition des cellules et avant tout sur la distance qui les sépare. Si l'on se sert pour cette épreuve de préparations microscopiques ordinaires, il ne faut pas oublier que les cellules, dans la gélatine qui doit servir à l'essai, sont en réalité beaucoup plus rapprochées les unes des autres que dans les gouttes fortement aplaties de ces préparations. Aussi une grande habitude est-elle nécessaire pour pouvoir tirer de là une conclusion suffisamment sûre. On arrive au contraire à ce résultat en prenant des gouttes de la nature (grandeur, forme, etc.) que nous emploierons plus tard. Ces gouttes sont portées sur une lame de verre

porte-objet ordinaire, ou mieux sur un porte-objet où sont gravés des carrés, et alors sur les traits gravés eux-mêmes. Les carrés donnent en effet des points de repère pour l'examen microscopique, qui devient par là plus facile et plus sûre. On n'emploie pas de lame de verre couvre-objet, et peut bien procéder tout de suite à cet examen pendant que la gélatine est encore fluide.

C'est un fait connu que des cellules qui, dans des liquides nourriciers peuvent donner des signes de vie, souvent ne le font pas dans la gélatine. De là cette conséquence, que d'ordinaire toutes les cellules semées dans la gélatine ne produisent pas de taches de végétation; néanmoins, les commençants en général, trouveront que le nombre de ces taches dépasse celui des cellules qu'ils ont observées au commencement de l'essai, et cela parce que plusieurs de ces dernières ont échappé à leur attention. *La faute qu'en somme on commet le plus souvent, c'est de semer un trop grand nombre de cellules.*

Si l'espèce à examiner est prédominante dans la levûre prise comme point de départ, il vaut mieux ne semer dans la gélatine qu'un petit nombre de cellules; dans le cas contraire, il faut opérer avec un nombre de cellules aussi grand que le comporte la préparation d'une culture pure. On procedera de même s'il s'agit d'obtenir en même temps, dans un essai, des cultures de plusieurs espèces originairement mêlées ensemble; dans ce cas, il faudra naturellement redoubler d'attention, car le danger qu'une tache de végetation puisse être formée à la fois par plusieurs espèces, est plus grand que lorsque l'espèce qu'on veut étudier prédomine dès l'origine dans la levûre sur laquelle on opére.

Le contrôle montre-t-il qu'on a semé trop peu ou trop de cellules, il faut, dans le premier cas, ajouter plus de cellules et, dans le second, plus de gélatine nourricière, le tout après un calcul préalable. Trouve-t-on, par ex., que le mélange renferme deux fois plus de cellules que le nombre voulu, on obtiendra la dilution convenable en y ajoutant une portion de gélatine aussi grande que celle qui s'y trouve déjà, et inversement, veut-on doubler le nombre des cellules, il suffira de procéder une seconde fois à une infection semblable à la première, supposé, bien entendu, qu'on ait rémarqué à quelle profondeur le fil de platine a été enfoncé dans le mélange d'eau et de cellules lors de la première infection.

Ce point important une fois éclairci, on porte rapidement une portion convenable de la gélatine nourricière infectée sur les lames de verre couvre-objet, qui sont assitôt recouvertes chacune d'une petite cloche. Si la table sur laquelle elles reposent est quelque peu horizontale, il n'est pas besoin d'autre orientement. Il faut, cela va sans dire, maintenir la gélatine toujours fluide dans le bain-marie, et y répartir également les cellules en la secouant. Comme il a été dit plus haut, on doit éviter toute formation d'écume. Après que les lames couvre-objet ont reçu leur portion de gélatine, on vide le ballon qui le renferme en n'en laissant au fond qu'one couche mince. Cette opération a un double but: en exposant le ballon avec son reste de gélatine à la même température que les lames couvre-objet, on a un moyen facile et sûr de savoir quand

la gelatine de ces derniers est figée, car lorsqu'elle l'est dans le ballon, elle le sera aussi sur les lames. Enfin ce reste de gélatine doit servir comme une espèce de réserve, au cas que les cultures dans les chambres viennent à échouer, ce qui pourtant n'arrive pas facilement si l'on opère avec soin. On se rappellera que les taches développées dans le ballon ne peuvent pas avec certitude être prises pour des cultures pures. A la température ordinaire d'un appartement, la gélatine dont il est toujours question ici (5 % de gélatine dans du moût clair houblonné à 14 % Ball. env.) met ordinairement à peine un quart d'heure à se figer; pour aller plus vite, on peut refroidir avec de la glace. Le motif pour lequel la gélatine fluides est mise de suite sur une lame couvre-objet et, seulement après qu'elle s'est figée, dans une position inclinée, c'est qu'ainsi on peut plus facilement et sans crainte de troubler la culture, fixer la lame au bord enduit de vaseline de l'anneau de la chambre humide; il est de plus à supposer que, de cette manière, la goutte sera moins bombée; mais on ne remarque en tout cas aucune différence bien prononcée. Il en est de même des gouttes qui se figent lentement à la température de la pièce et rapidement à l'aide de la glace.

Dès que la gèlatine est figée, on fixe la lame couvre-objet à l'anneau ci-dessus mentionné de manière que la culture soit tournée en bas. Par une pression exercée avec précaution sur les points du verre qui touchent l'anneau, on a soin de rendre la liaison complète, de façon que la chambre soit entièrement isolée du milieu environnant. Pour empêcher que la lame couvre-objet ne puisse glisser si elle vient à être touchée, il est bon d'y fondre en deux ou trois points un peu de cire à cacheter.

3. **Contrôle sur le porte-objet du microscope:** Les chambres une fois en ordre sont examinées à l'aide du faible grossissement mentionné plus haut; c'est seulement dans des cas douteux qu'il faut recourir à des objectifs plus forts. La première chose à faire est d'observer si les cellules sont disposées de manière que des taches isolées puissent se développer de chacune d'elles; dans ce cas, il n'est plus besoin de contrôle. Mais il arrive souvent que certaines parties de la préparation n'offrent pas une pareille certitude: il faut alors les délimiter. Cela peut se faire à l'aide de marques tracées sur la lame en question avec un pinceau fin et une couleur blanche à la gomme. Il n'est pas rare que les cellules soient réparties de façon qu'il devient nécessaire d'observer spécialement certaines d'entre elles et d'en suivre le développement. Pour ce contrôle, on peut faire des marques, par ex., des croix, à droite et à gauche, sur la platine du microscope, ainsi que des marques correspondantes sur le verre porte-objet de la chambre, de manière à pouvoir toujours retrouver l'image microscopique cherchée. C'est ce procédé que j'ai d'abord suivi; plus tard M. Will s'est servi de lames de verre couvre-objet, sur une face desquelles il avait gravé à l'acide fluorhydrique un grand nombre de lignes se coupant à angle droit et formant de petits carrés de 1 millim. de côté, dont les deux rangées extérieures contiguës étaient numérotées. Ces nombres et ces lignes fournissent d'excellents points de repère. M. Alfred Jörgensen m'a dit qu'il avait

toujours trouvé dans ces essais que le plus pratique était de placer les nombres chacun dans son carré, car non seulement ils servent à désigner certains carrés, mais, par les figures qu'ils forment, ils sont aussi d'un grand secours pour retrouver plus facilement la cellule dont on veut suivre le développement. On peut mettre la gélatine indifféremment sur l'une ou l'autre face, mais l'observation est sans doute rendue plus facile quand la culture est placée sur la face gravée. Dans ces derniers temps, nous avons aussi avec succès employé au laboratoire le marqueur [1]) Cet appareil se visse au tube au lieu de l'objectif, et, par le mouvement ordinaire à vis du microscope, est amené ensuite sur la lame couvre-objet, où, par un contact assez léger, il imprime un anneau coloré et délimite ainsi un point déterminé à l'avance. Le diamètre de l'anneau est de $1^1/_2$ millim.; s'il était plus petit, il serait encore d'une plus grande utilité dans des recherches de ce genre. On pourrait aussi, dans le même but, employer une table à microscope mobile avec des divisions. Dans tous les cas, il s'agit de s'assurer que les taches de végétation qui serviront plus tard pour les cultures en grand sont réellement des cultures absolument pures, c'est-à-dire provenant chacune d'une seule cellule. Le travail exécuté depuis le commencement de l'essai (préparatifs p. 95 etc.) jusqu'au point où nous en sommes arrivé prend environ 3 heures pour un expérimentateur un peu exercé.

Après s'être ainsi assuré des points de repère, on place les chambres et le ballon Chamberland avec son reste de gélatine dans un thermostat à 24—25 ⁰ C. A défaut de cet appareil, ils peuvent rester où ils sont à la température ordinaire d'un appartement. Si l'on travaille avec plusieurs chambres à la fois, il est pratique de les ranger dans un support spécial, où elles sont placées l'une au-dessus de l'autre sans se toucher. S'il y a un microscope de reste, on peut aussi visser une chambre à sa platine et mettre l'objectif au point de vision nette de la cellule dont on désire employer la végétation; il est alors très facile d'en suivre le développement pas à pas (voir mon mémoire, II Vol. 2 Liv., 1883, p, 28). Le même résultat s'obtient, quoique avec un peu plus de difficulté, en retirant de temps à autre les chambres et en les plaçant sur la platine d'après les marques. Dans tous les cas douteux, il ne faut pas manquer de recourir à un pareil contrôle. Il sera du reste en général facile et n'exigera pas de grands efforts si seulement on a opéré avec une dilution convenable et avec exactitude. Ce qui distingue cette manière de procéder, c'est qu'on n'abandonne rien au hasard, mais assure chacun de ces pas. C'est en outre un grand avantage que, sans troubler les végétations ni les exposer à une infection venant du dehors, on puisse les examiner à volonté non seulement avec de faibles grossissements, mais aussi avec de forts objectifs. Il devient aussi par là possible de faire des observations sur l'évolution, observations qui ont de l'importance pour la connaissance des espèces sur lesquelles on opère,

[1]) Klönne & Müller, Prinzenst.. 71, Berlin.

Dans les conditions ci-dessus décrites, il se développe des taches de végétations visibles à l'œil nu au bout de 2 ou 3 jours, suivant que les cultures ont été exposées à 24—25 ^{0} C. ou à la température ordinaire d'un appartement. Cette règle s'applique à tous les Saccharomyces et à toutes les cellules ressemblant à des Saccharomyces, Mycoderma vini, Myc. cerevisiæ, Torula de Pasteur, etc., qui ont jusqu'ici été étudiés au laboratoire. Chez les Saccharomyces et la plupart des formes que nous venons de nommer, les taches de végétations ont la forme et la grandeur de très petites têtes d'épingles et une couleur jaune gris clair; quelquefois elles ont l'aspect de la cire, la surface peut en être sèche ou un peu brillante; le bord vu sous un faible grossissement, en est assez nettement délimité ou velu. Toutes ces différences peuvent se montrer chez une seule et même espèce et dans la même culture, et varient suivant que les taches se sont développées dans une couche plus épaisse ou plus mince de gélatine.

Les taches du Mycoderma vini et du Mycoderma cerevisiæ, comme aussi de quelques espèces voisines, diffèrent assez des précédentes. Ces taches complètement développées sont en effet gris clair, à surface sèche et étendues comme des membranes, souvent creusées en forme de coupe. Tant qu'elles sont recouvertes par la gélatine, elles ressemblent aux taches des Saccharomyces, La couche de gélatine qui les recouvre est souvent si mince qu'il est très difficile de la découvrir, de sorte qu'on peut facilement être induit en erreur et croire qu'on a affaire avec une espèce autre que celle qui se trouve dans les taches déjà décrites.

Dans la couche de gélatine de l'une des lames de verre couvre-objet, il peut se développer 60 taches de végétations, et même en supposant, ce qui arrive quelquefois, qu'on n'en puisse employer que la moitié, une seule chambre suffit donc pour donner un grand nombre de cultures pures.

4. **Transport des cultures pures des taches dans un liquide nourricier**: Pour cette opération encore plus que pour les précédentes, il importe que l'air soit pur et en repos et les appareils complètement stérilisés. Les préparatifs généraux sont les mêmes. Il faut avoir sous la main une paire de pinces avec les fils de platine décrits plus haut et, en tant qu'on emploie plus d'une tache de la même lame couvre-objet, un nombre convenable de petites cloches avec leurs plaques de verre. Pour la culture dans un liquide nourricier, on se sert en général au laboratoire des ballons à deux cols de Pasteur ($^1/_8$ de litre) avec du moût houblonné stérilisé (env. 14 $^0/_0$ Ball.). La Fig, 3 représente, à une échelle reduite, un de ces ballons reposant sur un support en liège. Le tube mince est fermé à son extrémité avec un bouchon d'asbeste; au tube droit est adapté un tuyau en caoutchouc qui est fermé avec un bouchon en verre. S'il ne s'agit d'obtenir une culture pure que d'une seule espèce. on emploie 4—5 de ces ballons. Ce grand nombre a pour but de mettre l'opérateur à même d'obtenir une sorte de contrôle, en comparant les végétations développées dans les ballons. et de s'assurer qu'on obtient une végétation des cellules semées. Par accident il peut en effet entre autres arriver qu'un des ballons soit infecté par un organisme étranger. ou qu'il ne s'y développe aucune végétation, par ex. si

le fil de platine employé pour l'infection était trop chaud.

Les chambres sont examinées au microscope; on cherche les végétations dont les origines ont été vérifiées à l'avance pour avoir la certitude que les taches à employer proviennent chacune d'une seule cellule. Avec un pinceau fin et un peu de couleur blanche, on délimite ensuite sur la lame couvre-objet les taches qui ont été choisies; a-t-on en commençant l'essai employé l'appareil de Klönne & Müller, c'est naturellement superflu.



Fig. 3.

Une des lames couvre-objet est ensuite détachée de son anneau et placé, les taches tournées en haut, de préférence sur un fond obscur pour qu'elles ressortent bien distinctement. A l'aide d'une des pinces, on prend de la main droite un fil de platine et, après l'avoir passé rapidement dans la flamme d'une lampe voisine à gaz ou à esprit de vin, touche une des taches choisies. Si la lame couvre-objet doit être employée plus souvent, il faut naturellement chaque fois la recouvrir d'une petite cloche. De la main gauche on enlève le tuyau en caoutchouc d'un des ballons Pasteur, et, au même instant, porte de l'autre main le fil de platine infecté dans l'ouverture dénudée du tube, où on le laisse tomber. Le tube est ensuite incliné autant que cela peut se faire sans que liquide sorte, et amené en même temps dans la flamme, où il est réuni au tuyau en caoutchouc. Au lieu du ballon ci-dessus décrit, on peut aussi employer le modèle de Chamberland (Fig. 2 pag. 96) ou de Salomonsen; celui-ci a une ouverture plus étroite et, au lieu du capuchon en verre, un tuyau en caoutchouc, dont la partie supérieure est remplie de coton stérilisé; dans quelques cas, ces derniers ballons peuvent même être à préférer. Dans certaines occasions, on se servira également avec avantage des flacons représentés Fig. 4 en les fermant avec deux couches de papier à filtrer stérilisé. Pour les recherches sur les levûres alcooliques, une expérience de plusieurs années m'a montré que les ballons Pasteur sont en général les meilleurs. La question, dans tous les cas, est de travailler avec sûreté et aussi rapidement que possible. Pour ne pas agiter l'air plus que nécessaire, on attend pour secouer les ballons infectés qu'ils soient tous prêts. En ce qui concerne le ballon Pasteur, il faut en même temps qu'on le secoue faire rougir le tube mince recourbé, comme autrement on n'a aucune certitude que l'air qui y pénètre soit stérilisé. L'examen des chambres, le choix des taches microscopique et l'infection de 5 ballons avec ce qui s'y rapporte prennent env. 1 heure.



Fig. 4.

Après avoir été munis d'étiquettes, les ballons sont placés dans un thermostat à 25—28 ^{0} C. Dans le cours de 1—2 jours on observe un

développement bien marqué, et au bout de 2 jours, la fermentation est ordinairement en pleine activité, et il s'est formé une quantité assez grande de levûre. Cette règle s'applique bien surtout aux Saccharomyces, mais en somme aussi à la plupart des espèces nommées dans ce mémoire; cependant le Mycoderma vini, le Myc. cerevisiæ et plusieurs formes voisines ne donnent pas lieu, comme on sait, à de pareils phénomènes de fermentation.

Jusqu'au moment où l'on ouvre les chambres, cette méthode se distingue par son absolue certitude, mais avec l'ouverture des chambres commence en même temps l'incertitude, car une infection provenant des vêtements de l'opérateur, de l'air, etc. devient alors possible et d'autant plus dangereuse qu'on n'a pas encore obtenu une culture en grand de cellules vigoureuses pour soutenir, au besoin, la concurrence contre des rivaux étrangers. Sous ce rapport, la méthode est inférieure à celle que j'avais d'abord élaborée (pag. 94). Le plus sûr sera donc de n'employer qu'une seule tache de chaque lame de verre couvre-objet.

Mais, pour ne pas non plus travailler ici au hasard et en aveugle, on peut, pendant le temps employé á infecter les ballons, placer à côté quelques flacons ouverts à large goulot et renfermant du moût stérilisé comme les ballons, puis, quand ceux-ci sont prêts, les fermer en les coiffant de deux couches de papier à filtrer stérilisé et les mettre ensuite dans le thermostat à 25—28 ^{0} C. De cette manière on est renseigné sur le contenu de l'air, pendant le temps dont il s'agit, en microorganismes pouvant se développer dans le liquide nourricier employé. Dans mon mémoire cité plus haut, j'ai déjà montré qu'en général ce danger ne sera pas grand si l'on travaille dans une pièce propre et un air tranquille. Plus tard il a été fait un assez grand nombre d'analyses suivant la méthode ici décrite, et elles ont donné pour résultat que, sur 3 flacons, il y en avait en moyenne 2 d'infectés. Cette infection était due exclusivement au Penicillium glaucum; dans aucun cas je n'ai trouvé de bactéries ni de cellules de levûre.

5. **Examen des végétations des ballons et choix de la ou des espèces qu'on veut avoir**: Il a été dit plus haut qu'en remplissant les conditions que j'ai indiquées, on obtiendrait une culture en grand au bout de 2 jours env. En tant que, dans le transport des cellules des taches dans les ballons, on a pu éviter toute infection étrangère, chaque ballon renfermera aussi une culture pure. Les flacons cidessus mentionnés, de même que les analyses dont il sera question plus bas, peuvent fournir quelques renseignements sur ce point faible de la méthode. De chaque ballon on prend maintenant, avec tout le soin nécessaire, un échantillon qui est examiné au microscope. Les ballons dont les cellules sont semblables renfermeront aussi souvent la même espèce. Mais ici il faut se rappeler que les différences qui, dans les conditions indiquées, peuvent se présenter, sont en général petites et exigent pour être remarquées un œil très exercé. L'examen microscopique à lui seul n'offre pas une garantie suffisante; il faut le combiner avec les autres moyens de contrôle dont on dispose, botaniques ou chimiques. Comme on le voit par mes mémoires, le développement des ascospores et les végétations des voiles jouent un rôle important dans l'analyse des Saccharomyces.

Nous avons montré comment on peut, d'une manière sure et relativement facile, obtenir des cultures pures de Saccharomyces et de microorganismes analogues. Naturellement, il sera toujours possible d'apporter des modifications à ces méthodes; mais, dans tous les cas, le problème à résoudre restera le même. Dans ce qui précède, j'ai communiqué les résultats de l'expérience acquise par un travail de plusieurs années dans le laboratoire de Carlsberg. J'ai principalement insisté sur ce point, que chaque travail doit être exécuté avec sûreté et sous un contrôle constant. D'après le modèle que M. Pasteur, plus que tout autre, a donné dans ces ouvrages, et que tous ceux qui ont visité son célèbre laboratoire ont vu réalisé, j'ai cherché à montrer combien il importe de travailler avec soin et précaution, et que toute faute à cet égard s'expie.

Bien que ces communications, d'après leur nature, s'adressent surtout à des commençants, je suppose cependant aussi que l'expérimentateur plus exercé pourra en retirer quelque profit, et pour mes élèves elles seront un souvenir de mes leçons.

- -

Il reste à expliquer comment on emploie les petites portions obtenues de levûre absolument pure pour produire les grandes masses que consomme l'industrie, comment on procède au choix d'une race convenable, et comment elle doit être traitée pour qu'on puisse obtenir tout de suite un rèsultat favorable. Je dois cependant remettre à une autre fois de donner une communication détaillée là dessus, et me borner à me référer à ce que j'ai déjà publié sur ces questions. La raison en est que, sous ce rapport, de nouvelles améliorations seront, je l'espère, prochainement introduites dans la brasserie de Vieux Carlsberg. Pendant l'année 1885, M. Kühle, directeur de la brasserie, et moi, nous avons travaillé á faire installer dans la cave même à fermentation un appareil pour la fabrication continue et en grand d'une levûre absolument pure, de manière que tous les 10 jours env. une grande portion de cette levûre soit livrée à la brasserie. La levûre ayant déjà servi et qui est un peu infectée sera ainsi, à de courts intervalles, remplacée par de la levûre absolument pure. Mais ces essais n'étaient pas encore terminés lorsqu'en novembre 1885 j'ai achevé ce mémoire. Les lecteurs qui déjà maintenant voudraient savoir comment on produit la levûre pure à l'usage de l'industrie, pourront en attendant consulter les remarques à ce sujet qui se trouvent dans mes mémoires, notamment dans Zeitschr. für das gesammte Brauwesen, München 1884, p. 273, et les renseignements qui, en partie d'après mes communications verbales, ont été publiés plus tard dans différentes revues zymotechniques, en particulier par MM. Aubry, Bĕlohoubek, Jörgensen et Will.

C'est en 1883 que j'ai commencé sur une grande échelle mes essais pratiques avec de la levûre pure, et que j'ai été autorisé par M. le capitaine Jacobsen, propriétaire des célèbres brasseries de Vieux Carlsberg et fondateur du laboratoire, à l'introduire dans sa fabrication. Lorsque les premières difficultès eurent été surmontées, et que M. Jacobsen se fut assuré qu'il s'agissait ici d'un véritable progrès, il l'appuya énergiquement

de sa grande autorité universellement reconnue. Malgré la méfiance avec laquelle beaucoup de brasseurs même intelligents accueillirent la levûre pure, elle fut cependant essayée en relativement peu de temps dans la plupart des pays producteurs de bière, et, pour le moment, elle est introduite comme un élément fixe de l'exploitation non seulement dans toutes les grandes brasseries danoises, mais aussi dans un très grand nombre de brasseries de l'étranger. Que, malgré l'opposition soulevée par la station d'essais de l'école Royale d'agriculture de Berlin, elle se soit cependant répandue rapidement dans les pays plus renommés pour la fabrication de la biére basse, l'Allemagne et l'Autriche, c'est là un résultat dont tout l'honneur revient au laboratoire de M. Aubry, à Münich.

VI.

LES VOILES CHEZ LE GENRE SACCHAROMYCES.

(PREMIER MÉMOIRE. AVEC LES PLANCHES I—VIII).

OBSERVATIONS GÉNÉRALES.

C'est un fait connu que la bière, le vin et autres liquides analogues se couvrent en général rapidement d'un voile, lorsqu'ils sont exposés dans un verre ouvert à l'action directe de l'air. Ces voiles peuvent être formés de différents microorganismes: Bactéries, Saccharomyces, cellules ressemblant à des Saccharomyces et moisissures. C'est tantôt une espèce, tantôt une autre qui prédomine, et le voile en reçoit aussitôt un cachet plus au moins particulier.

Dans les mémoires sur les bactéries, les moisissures et les levûres que j'ai publiés depuis 1878 dans ce recueil ou ailleurs, j'ai décrit successivement un grand nombre de formes qui produisent des voiles, et notamment donné des exemples d'une série d'espèces à cellules ressemblant à des Saccharomyces et différant plus au moins les unes des autres, qui forment des voiles analogues à ceux du Sacch. Mycoderma, et dont plusieurs du moins peuvent bien être déterminées par ce nom spécifique. Mais aucune de ces espèces ne développe les endospores si caractéristiques du genre Saccharomyces, et ne peut par conséquent y être rapporté. C'est ce que j'ai de nouveau vu confirmé en revoyant dernièrement mes recherches antérieures sur ce sujet. J'avais spécialement porté mon attention sur les formes produisant des voiles, qui apparaissent toujours avec tant de facilité sur la bière et qui, plus que toutes les autres, semblent être sous-entendues lorsqu'on nomme le nom spécifique de Sacch. Mycoderma. Sous ce nom systématique se cachent en réalité plusieurs espèces, et il n'a pas la même signification chez les différents auteurs.

Les formes auxquelles on applique surtout le nom de Sacch. Mycoderma se distinguent en ceci, qu'elles peuvent facilement et rapidement,

comme sans préparation, former des voiles sur plusieurs liquides organiques. Il ne semble pas que cette formation soit précédée d'aucune fermentation: cependant les cellules ne sont pas denuées de puissance fermentative. Leurs voiles ont du moins sur la bière et le moût un aspect sec et grisâtre; elles ont d'abord l'apparence d'une fine poussière, plus tard elles deviennent plus épaisses, se plissent ordinairement et prennent une couleur plus claire. Il y a un grand nombre de bulles d'air entre les cellules, et celles-ci, si on les sème dans un nouveau liquide nourricier, restent à la surface sans tomber au fond[1]).

D'autres espèces ressemblant à des Saccharomyces, par ex., la forme décrite dans mon mémoire sur les Torulas de M. Pasteur (voir le présent recueil, II Vol. 2 livraison, 1883, p. 49—50), forment aussi des pellicules qui rappellent beaucoup les précédentes, mais qui ne sont pas plissées. Les voiles formés par le Chalara Mycodorma et la Monilia candida en diffèrent davantage; chez le premier de ces organismes, ils ont en effet un aspect visqueux et un peu brillant et, chez le second, ils présentent des différences d'un autre genre.

Sous le nom de Monilia candida je désigne une moisissure qui, dans certaines phases de son développement, apparaît avec des cellules ressemblant à des Saccharomyces et remarquables surtout par leur propriété de provoquer, sans inversion préalable, la fermentation alcoolique dans une dissolution de saccharose, par conséquent de faire fermenter directement cette espèce de sucre. J'ai publié quelques communications à ce sujet dans la revue zymotechnique de Fasbender 1883 et dans les »Berichte der deutschen botan. Gesellsch.« 1884. Tandis que le voile du Mycod. cerevisiæ, dans une culture de moût, est formé sur-le-champ par les cellules semées à la surface, les cellules de la Monilia candida tombent au fond des ballons pour s'y multiplier comme levûre de depôt, pour provoquer la fermentation et enfin pour remonter de nouveau avec les bulles d'acide carbonique à la surface, où le voile se développe ensuite rapidement. De même que l'Oïdium lactis et plusieurs autres moisissures qui vivent à la surface des liquides, la Monilia candida peut aussi, dans un liquide nourricier convenable, développer une couche blanche, cotonneuse, qui diffère complètement de tous les autres voiles cidessus mentionnés (pour plus détails sur ces voiles, voir le texte danois, p. 168--171).

Des voiles d'une autre espèce que les précédents sont ceux de plusieurs des nombreuses levûres que M. Pasteur a appelées Torula, du Sacch. apiculatus et de tous les vrais Saccharomyces. La formation des voiles est en somme un phénomène très général dans le monde des microorganismes, et elle est aussi fréquente

---

[1]) Les cellules de levûre mycodermique mentionnées plus haut méritent évidemment une étude plus approfondie tant au point de vue théorique que pratique. Dans son intéressant mémoire »Ueber den Einfluss der Hefe auf die Qualität des Bieres« (Böhm. Bierbrauer, Prag 1885, p. 447), M. le professeur Bělohoubek appelle entre autres l'attention sur les masses considérables de bière qui annuellement sont gâtées par le Mycoderma cerevisiæ.

chez les bactéries que chez les champignons proprement dits et chez des formes appartenant à différentes divisions dans le système, On trouvera ci-après une description de la formation des voiles des levûres que nous venons de mentionner et des vrais Saccharomyces; elle est bien faite d'après des observations sur les Saccharomyces, mais, dans les limites de mes recherches, elle s'applique aussi en somme aux autres formes.

Expose-t-on, en ayant soin de ne pas les troubler, des cultures de Saccharomyces dans du moût stérilisé pendant un temps plus ou moins long à la température ordinaire d'un appartement, il apparaît successivement de petites taches de levûre tant sur les bords du liquide et contre les parois du verre que sur sa surface même; souvent elles se rassemblent pour former des lignes, des groupes et des ramifications réticulaires; à mesure qu'elles se développent, elles peuvent donner naissance à des îles assez grandes, dont la partie supérieure est assez plane et l'inférieure hémisphérique ou conique. Des îles en partie fusionnées et par conséquent peu cohérentes sont fréquentes. Plonge-t-on une baguette en verre dans une pareille masse, les différentes îles s'y déposent chacune séparément et on peut ainsi les pêcher pour les examiner plus à loisir. En continuant à croître, elles peuvent se réunir et finalement couvrir toute la surface d'un voile continu, qui souvent est accompagné au-dessus du liquide, sur les parois du verre, d'une ceinture entière de levûre. Les petites taches observées en premier lieu proviennent sans doute d'une seule cellule ou, tout au plus, de quelques cellules en très petit nombre qui, entraînées par le dégagement de l'acide carbonique, ont remonté à la surface. Cependant la formation proprement dite des voiles n'a lieu qu'à la fin de la fermentation principale et après la disparition de l'écume qui l'accompagne. Toutefois on peut avant ce moment observer des taches faiblement développées, pendant que la fermentation est encore assez active et qu'il se dégage en grand nombre des bulles d'acide carbonique. Il y a des ballons où les voiles commencent à se former le long du bord du liquide comme un anneau, d'autres où le développement part du centre de la surface et de là se poursuit dans toutes les directions.

Dans ces conditions, on n'observe qu'un faible développement chez le Sacch. apiculatus et chez plusieurs formes des Torulas, tandis qu'il est très marqué chez les vrais Saccharomyces. Lorsque nos cultures sont restées en repos pendant quelques semaines sans être secouées, la surface du liquide est d'ordinaire plus ou moins complètement couverte d'un voile épais et entouré d'une large ceinture de levûre. On trouve souvent dans celle-ci une masse épaisse de levûre d'un gris jaune clair et d'un aspect mucilagineux: il en est de même de la membrane. Exceptionnellement, elle peut cependant aussi paraître plus sèche et ressembler par là aux membranes ci-dessus mentionnées du Mycoderma cerevisiæ. Elle est en général unie, plus rarement inégale et comme semée de petits tertres; dans ce dernier cas, elle avait souvent aussi un aspect cartilagineux. En s'épaississant, le voile et la ceinture de levûre prennent en même temps une teinte plus claire. Si l'on examine des voiles vieux et épais de Saccharomyces, on voit, surtout en secouant les ballons, qu'il s'en détache des fragments plus ou moins grands qui tombent au

fond, où il peut s'en former peu à peu toute une couche. Mais la partie restante plus au moins déchirée du voile peut se réparer elle-même et remplir peu à peu le vide produit; il n'est pas rare alors qu'il soit marbré de parties épaisses et plus claires, les plus anciennes, et de parties minces plus foncées, celles de formation récente. L'aspect de ces fragments et de ces grumeaux épais et mucilagineux rappelle beaucoup la formation des *Zooglées* chez les bactéries.

Parmi les nombreuses espèces de Saccharomyces dont j'ai étudié les voiles, se trouvent aussi les six sur lesquelles j'ai publié une série de recherches dans mes mémoires antérieurs. Ce sont principalement ces espèces que javais en vue dans la description qui précède.

En examinant leurs voiles au microscope, on s'aperçoit bientôt que les végétations peuvent y être assez différentes pour une seule et même espèce; c'est ce que montrent les Fig. 3, Pl. III—VIII. Ces figures représentent six groupes de cellules, chacun appartenant à une espèce et provenant tous de voiles formés dans des cultures poursuivies, pendant plusieurs mois, dans des ballons Pasteur à deux cols (Fig. 3, pag. 102) avec du moût houblonné stérilisé (env. 14 $^0/_0$ Ball.), à la température ordinaire d'un appartement. Les cellules semées sont représentées sur les Pl. I—II; ces six groupes de figures nous montrent les végétations de nos six espèces, telle qu'elles se développent à cette même température, dans de la jeune levûre de dépôt dans les cultures de moût ci-dessus mentionnées, lorsque le liquide nourricier est renouvelé plusieurs fois à de courts intervalles. En infectant de cette levûre des ballons avec du moût, mais qui sont ensuite exposés pendant 24 heures à la température de 26 ^{0} C., on obtient de la levûre de dépôt, dont les cellules ont un aspect semblable et présentent la même image. Les figures des Pl. I et II nous montrent en un mot des végétations jeunes et vigoureuses dans de la levûre ordinaire de dépôt, telles que je les employais pour infecter les ballons dans lesquels se développaient plus tard des voiles.[1]) Nous allons maintenant examiner de plus près les voiles dont il s'agit.

La Fig. 3, Pl. III. représente l'espèce désignée provisoirement sous le nom de Sacch. cerevisiæ I. Comme le montre la figure, quelques cellules sont isolées, tandis que d'autres sont réunies en colonies plus ou moins ramifiées, dont les éléments peuvent être ovales, en forme de boudin court ou très allongés: dans ce dernier cas, les colonies rappellent un peu un mycelium. Quelques cellules ressemblent à celles qui

---

[1]) On trouvera une description de ces six espèces dans mon mémoire »Les ascospores chez le genre Saccharomyces« (Résumé du compte rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg, II Vol. 2 livraison, Copenhague 1883, p. 32—33).

ont été semées (Fig. 1, Pl. I), mais elles ont en général pris une forme plus allongée et souvent aussi irrégulière. Les bourgeons, dans plusieurs cas, se comportent également d'une autre manière que chez la levûre ordinaire de dépôt. Cependant le plus remarquable, c'est que nous avons ici une espèce dont la forme habituelle de la levûre de dépôt, d'après le système jusqu'ici en usage, doit être regardée comme celle d'un Sacch. cerevisiæ type, mais dont le voile est composé de cellules entièrement différentes et ayant la même forme que celles d'un Sacch. Pastorianus bien caractérisé. Relativement à cette espèce comme aux suivantes, nous devons faire observer qu'un examen détaillé des figures donne, mieux que toute description, une représentation des rapports et des différences qui existent entre elles.

Dans la Fig. 3, Pl. IV, est répresentée une végétation correspondante du Sacch. Pastorianus I. On trouve également ici des cellules de la même forme que celles qui ont servi à l'ensemencement (Fig. 2, Pl. I); elles sont cependant en général plus petites, et il y en a parmi elles qui sont plus allongées et de forme baroque, quelquefois presque filiformes. Les colonies sont moins peuplées que chez l'espèce précédente.

La Fig. 3, Pl. V, représente le Sacch. Pastorianus II. Les remarques sur l'espèce précédente sont aussi en somme applicables à celle-ci (comp. la figure citée avec celle des cellules de l'ensemencement, Fig. 3, Pl. I).

La troisième espèce de ce groupe, le Sacch. Pastorianus III, est représentée Fig. 3, Pl. VI. Les cellules en forme de boudin et filiformes, souvent réunies en colonies remifiées et enchevètrées, sont ici très prédominantes; plusieurs cellules ressemblent plus à des formes de bactéries qu'à des Saccharomyces. Il s'est en somme opéré une transformation très frappante (comp. les cellules de l'ensemencement, Fig. 1, Pl. II). Cependant on trouve aussi, comme à l'ordinaire, des cellules ressemblant à celles de l'ensemencement.

Dans la Fig. 3, Pl. VII, on voit des exemples d'une pareille végétation due au Sacch, ellipsoïdeus I. Le développement de colonies formées de cellules en forme de boudin, courtes et allongées, est ici ce qu'il y a de plus caractéristique. Les ramifications sont souvent verticillées ou opposées. On observe aussi des cellules de forme baroque. minces et très allongées, et d'autres de la même forme que celles de l'ensemencement (Fig. 2, Pl. II). Très frappante est la transformation qui a eu lieu: le Sacch. ellipsoïdeus type caractérisé dans sa forme de levûre de dépôt par ses cellules ovales, est devenu dans sa forme de voile un des Sacch. Pastorianus du système.

La dernière de mes six espèces, le Sacch. ellipsoïdeus II, présente un changement de forme principalement dans le même sens. Les cellules de l'ensemencement sont représentées Fig. 3, Pl. II, et celles du voile, Fig. 3, Pl. VIII.

Dans toutes les Fig. 3 des planches III—VIII, nous trouvons des exemples de formes irrégulières, comme aussi du fait q'une cellule mère a donné naissance à une couronne ou à un arbuste de bourgeons plus ou moins serrés les uns contre les autres. Cette forme de bourgeonnement n'est rare chez aucune des six espèces, et c'est seulement par l'effet

du hasard que les figures en donnent si peu d'exemples. Elle rappelle beaucoup la forme dont M. Reess a fait une espèce sous le nom de Sacch. conglomeratus. Un grand développement de cellules allongées, isolées et en colonies, ne s'est produit que dans les vieilles cultures, et le rapport entre ce développement et celui de cellules ovales et en forme de boudins courts a en général été variable, comme, de ces deux espèces de cellules, tantôt l'une tantôt l'autre était prédominante. Les figures ont été dessinées d'après les résultats de nombreuses cultures comparés ensuite avec ceux de plusieurs autres, et reproduisent les principales formes qui ont été observées. (Relativement à d'autres détails tant ici qu'ailleurs, voir le texte danois).

En comparant les six formes de voiles que nous venons d'examiner, on trouve qu'elles ont toutes dévéloppé des cellules plus allongées, et, en général aussi, des colonies plus complexes que les cellules ayant servi à l'ensemencement. Cette différence est surtout marquée chez le Sacch. cerevisiæ I et les Sacch. ellipsoïdeus I et II, dont les voiles, comme on l'a vu, assignent à ces trois espèces une tout autre place dans le système que leurs formes comme levûres du dépôt. Le Sacch. Pastorianus III se fait remarquer par son développement de cellules très allongées, souvent filiformes et ressemblant à des bactéries. Le Sacch. Pastorianus I et le Sacch. Pastorianus II ont entre eux la plus grande ressemblance; il y en a également beaucoup entre le Sacch. ellipsoïdeus I et le Sacch. ellipsoïdeus II. Malgré la ressemblance entre nos six espèces, un examen plus attentif fait cependant découvrir des différences: mais elles sont d'une nature si difficile et si fine qu'on ne peut, à vrai dire, en donner d'autre expression que celle que nous montrent les groupes des figures, et prend-on les diverses cellules isolément, toutes les limites disparaissent. Ces indications, tout obscures qu'elles fussent, n'étaient cependant pas sans importance pour moi. En effet, dans mes recherches sur les microorganismes, je me suis, dès l'origine, toujours efforcé de trouver des caractères chez les formes sur lesquelles j'expérimentais, afin d'obtenir par là des points de départ fixes. Un des problèmes qui m'ont le plus occupé a ainsi été la question fondamentale et de nos jours si brûlante des espèces et de leur délimitation, et c'est ce qui a donné à mes travaux leur cachet botanique si marqué. C'est également surtout à ce point de vue que j'ai commencé les recherches exposées ici. Les observations ci-dessus mentionnées une fois terminées, la question pouvait recevoir une forme plus déterminée et être soumise à un traitement expérimental. On en trouvera les résultats les plus importants dans le chapitre suivant. Comme à l'ordinaire, dans le cours du travail principal il s'est ouvert de nouvelles voies indirectes: je donnerai également quelques renseignements à ce sujet.

EXPÈRIENCES.

En tant que, pour le moment, s'étendent nos connaissances, nous devons admettre que c'est une condition commune pour toutes les formations de voiles mentionnées dans le chapitre précédent, que les microorganismes sur lesquels on opère doivent avoir directement accès à l'air atmosphérique, et que l'afflux doit en être abondant pour que les voiles puissent se développer avec rapidité. C'est ce que confirment les essais faits avec des Saccharomyces. Prend-on, par ex., une série de ballons Pasteur exactement du même modèle, renfermant chacun une égale portion du même moût stérilisé, et, après les avoir infectés avec une levûre très susceptible de développer un voile, le Sacch. ellipsoïdeus II par ex., en plonge-t-on la moitié dans l'eau avec leur tube recourbé, de manière à les isoler du contact de l'air et à forcer l'acide carbonique provenant de la fermentation à se dégager à travers l'eau, on trouvera qu'il s'y forme bien après quelque temps un voile, mais qu'il se développe plus lentement et avec bien moins d'énergie que dans les ballons non isolés du contact de l'air. Dans les mêmes conditions, le développement des membranes est plus rapide dans les ballons Chamberland (Fig. 2, p. 96) que dans les ballons Pasteur, et encore plus rapide et plus marqué lorsqu'on se sert des flacons représentés p. 102 et coiffés de deux couches de papier à filtrer stérilisé. En outre, comme il est facile, dans ces flacons, de prendre des échantillons en un point quelconque des voiles sans beaucoup les troubler, je les ai employés de préférence pour mes essais, et, en l'absence d'autre indication, c'est toujours eux que j'ai en vue. Ils avaient chacun une capacité de 142 c. c. et renfermaient 70 c. c. de moût houblonné clair stérilisé (env. 14 %/o Ball,), tel qu'on le trouve ordinairement dans les brasseries à fermentation basse. C'est ce liquide nourricier dont je me suis le plus fréquemment servi dans mes expériences sur les fermentations, et qui est si souvent mentionné dans mes mémoires. Les cellules destinées à l'ensemencement ont été préparées de la même manière que pour mes recherches sur la production des ascospores, et comprenaient les mêmes six espèces. Après que les cellules sur lesquelles on opérait avaient été cultivées quelque temps dans le moût à la température ordinaire d'un appartement, on en transportait un petit nombre, jeunes et vigoureuses, dans un nouveau moût de la même nature que le précédent, et les cultivait à 26—27 ° C. pendant 24 heures env. Le liquide en fermentation était alors décanté et une égale portion du même moût versé sur le précipité de levûre, après quoi on secouait les ballons pour obtenir une égale répartition des cellules. Quelques gouttes de ce mélange étaient ensuite semées dans chacun des flacons ci-dessus décrits. Il va sans dire que tous ces travaux étaient exécutés de manière à éviter toute infection du dehors.

Avant d'aller plus loin, il est bon de jeter un coup d'œil sur les cellules qui ont servi de points de départ aux expériences: elles sont représentées Pl. I et II dans l'ordre où les espèces ont été traitées, tant dans ce mémoire que dans les précédents.

La Fig. 1, Pl. I, représente le Sacch. cerevisiæ I; il se compose en majeure partie de grandes cellules rondes et ovales, sans cellules allongées proprement dites.

Les cellules du Sacch. Pastorianus I (Fig. 2, Pl. I) ont en somme un autre aspect; elles sont d'ordinaire allongées en forme de boudin, mais parmi elles on trouve aussi, quoique seulement comme mélange secondaire, des cellules rondes et ovales plus ou moins grandes dont beaucoup ressemblent à l'espèce précédente. Ce qui est dit du Sacch. Pastorianus I s'applique aussi aux autres espèces du même groupe, le Sacch. Pastorianus II (Fig. 3, Pl. I) et le Sacch. Pastorianus III (Fig. 1, Pl. II). Dans les essais de cultures dont il s'agit, ils sont en somme tous les trois presque identiques. Les différences, comme le montre un coup d'œil jeté sur les figures, sont en tout cas très petites.

Le Sacch. ellipsoïdeus I (Fig. 2, Pl. II), en ce qui concerne la forme, est très voisin du Sacch. ellipsoïdeus II (Fig. 3, Pl. II); ces deux espèces se distinguent par la prédominance des cellules rondes et ovales; elles ont aussi l'une et l'autre des cellules en forme de boudin, mais qui, en général, ne sont guère aussi nombreuses que le montrent les figures.

Compare-t-on maintenant entre eux les 6 groupes de cellules représentés sur les Pl. I et II, on trouve *qu'il est assez facile d'y distinguer 3 divisions, dont la première comprend le Sacch. cerevisiæ I, la deuxième les 3 espèces du groupe Sacch. Pastorianus et la trosième, les 2 espèces du groupe Sacch. ellipsoïdeus.* Cela n'est vrai cependant que pour les cultures pures et dans les conditions d'existence mentionnées plus haut.

Comme les espèces ainsi cultivées pendant des années et à travers des générations sans nombre, sous les mêmes influences extérieures, ont constamment montré les mêmes différences, cela indique une différence chez les cellules mêmes, quelque chose qui leur est propre. Les conditions d'existence viennent-elles à changer, les choses, comme on le verra dans ce qui suit, se passent autrement. J'ai déjà, dans des travaux antérieurs, montré l'influence des facteurs extérieurs sur le développement de la forme des cellules[1]; nous ferons maintenant, dans un nouveau domaine, plus intime connaissance avec la grande variabilité qui peut s'y manifester, variabilité si grande que tout semble être fluide. L'observateur attentif en aperçoit cependant les limites et distingue le stable dans l'instable. Nous nous efforcerons de trouver les lois de ce courant de métamorphoses que les expériences déterminent.

Les cultures ci-dessus décrites des six espèces une fois semées chacune dans un flacon contenant du moût, les flacons étaient de nouveau coiffés convenablement de papier à filtrer et exposés aussitôt dans un thermostat à une série de températures décroissantes. On avait soin

---

[1]) Voir notamment mon mémoire sur la formation des ascospores p. 42. J'y fais voir comment le Sacch. cerevisiæ (forme de levûre basse de la bière), après un certain traitemeut, développe à 27° C. des cellules à l'aspect typique normal, mais à $1\frac{1}{2}$° C. des colonies enchevêtrées avec des ramifications ressemblant à du mycelium.

que, peu de temps avant l'infection, ils eussent la température voulue. Comme point de départ commun pour l'examen microscopique, on étudiait toujours les premières traces de la formation des voiles, dès qu'ils étaient assez distincts pour pouvoir être observés avec certitude à l'œil nu. Les végétations en provenant sont représentées Fig. 1 et 2, Pl. III—VIII. Les végétations qui se sont produites après un long délai ont aussi été étudiées, et les résultats en sont également indiqués. Chaque espèce a été l'objet d'un grand nombre d'essais. Voici les résultats auxquels je suis arrivé.

Sacch. cerevisiæ I.

(Pl. III, Fig. 1—3).

A 38 ° C. aucune formation de voile.
- 33—34 ° C au bout de 9—18 jours, taches faiblement développées, avec une végétation comme .... Fig. 2.
- 26—28 ° C. au bout de 7—11 jours - .... Fig. 2.
- 20—22 ° C. — 7—10 jours - .... Fig. 2.
- 13—15 ° C. — 15—30 jours - .... Fig. 1.
- 6—7 ° C. — 2—3 mois - .... Fig. 1.
- 5 ° C. aucune formation de voile.

Sacch. Pastorianus I.

(Pl. IV, Fig. 1—3).

A 34 ° C. aucune formation de voile.
- 26—28 ° C. au bout de 7—10 jours, taches faiblement développées avec une végétation comme .... Fig. 1.
- 20—22 ° C. au bout de 8—15 jours - .... Fig. 1.
- 13—15 ° C. — 15—30 jours - .... Fig. 2.
- 6—7 ° C. — 1—2 mois - .... Fig. 2.
- 3—5 ° C. — 5—6 mois - .... Fig. 2, cependant sans grandes colonies.
- 2—3 ° C. aucune formation de voile.

Sacch. Pastorianus II.

(Pl, V, Fig. 1—3).

A 34 ° C. aucune formation de voile.
- 26—28 ° C. au bout de 7—10 jours, taches faiblement développées avec une végétation comme .... Fig. 1.
- 20—22 ° C. au bout de 8—15 jours - .... Fig. 1.
- 13—15 ° C. — 10—25 jours - .... Fig. 2.
- 6—7 ° C. — 1—2 mois - .... Fig. 2.
- 3—5 ° C. — 5—6 mois - .... Fig. 2.
- 2—3 ° C. aucune formation de voile.

Sacch. Pastorianus III.

(Pl. VI, Fig. 1—3).

A 34 ^{0} C. aucune formation de voile.
- 26—28 ^{0} C. au bout de 7—10 jours, taches faiblement développées avec une végétation comme .... Fig. 1.
- 20—22 ^{0} C. au bout de 9—12 jours — .... Fig. 1.
- 13—15 ^{0} C. — 10—20 jours — .... Fig. 2.
- 6—7 ^{0} C. — 1—2 mois — .... Fig. 2.
- 3—5 ^{0} C. — 5—6 mois — .... Fig. 2, cependant sans colonies fortement développées.
- 2—3 ^{0} C. aucune formation de voile.

Sacch. ellipsoïdeus I.

(Pl. VII, Fig. 1—3),

A 38 ^{0} C. aucune formation de voile.
- 33—34 ^{0} C. au bout de 8—12 jours, taches faiblement développées avec une végétation comme .... Fig. 1.
- 26—28 ^{0} C. au bout de 9—16 jours - .... Fig. 1.
- 20—22 ^{0} C. — 10—17 jours - .... Fig. 1, cependant en général avec une tendance vers . . Fig. 2.
- 13—15 ^{0} C. au bout de 15—30 jours comme .... Fig. 2.
- 6—7 ^{0} C. — 2—3 mois - .... Fig. 1.
- 5 ^{0} C. aucune formation de voile.

Sacch. ellipsoïdeus II.

(Pl. VIII, Fig. 1—3),

A 40 ^{0} C. aucune formation de voile.
- 36—38 ^{0} C. au bout de 8—12 jours, taches faiblement développées avec une végétation comme .... Fig. 1.
- 33—34 ^{0} C. au bout de 3—4 jours - .... Fig. 1.
- 26—28 ^{0} C. — 4—5 jours - .... Fig. 1 et 2.
- 20—22 ^{0} C. — 4—6 jours - .... Fig. 1 et 2.
- 13—15 ^{0} C. — 8—10 jours - .... Fig. 2.
- 6—7 ^{0} C. — 1—2 mois - .... Fig. 2.
- 3—5 ^{0} C. — 5—6 mois - .... Fig. 2.
- 2—3 ^{0} C. aucune formation de voile.

Dans l'exposé qui précède de mes recherches sur la formation des six espèces de voiles à différentes températures, les figures jouent un rôle très essentiel. Elles ont été exécutées en partie par moi-même, en partie par mon aide, M. Holm, et dessinées d'après nature. J'ai attaché de l'importance à ce qu'elles donnassent une idée aussi complète qu'exacte des formes sous lesquelles se montre chaque espèce dans les conditions indiquées; il ne peut naturellement être question d'épuiser la matière, car les cellules de chaque espèce peuvent, jusque dans la même

culture, présenter une infinité de petits changements de forme, et il s'agissait donc seulemeut de saisir les traits prédominants et de les fixer. Dans ce qui suit, nous jetterons d'abord un coup d'œil sur l'ensemble des formes de voiles de chaque espèce, et comparerons ensuite entre elles les six espèces pour voir quels sont les enseignements qu'on peut retirer de cette comparaison.

Nous commencerons, comme d'habitude, par le Sacch. cerevisiæ I. La Fig. 2, Pl. III, en représente, on se le rappelle, la végétation à des températures plus élevées (20—34 ^{0} C.). En la comparant avec la semence (Fig. 1, Pl. I), on voit que les colonies sont devenues plus nombreuses et que les cellules en forme de boudin ou de forme un peu baroque ne sont pas rares. Les végétations, aux températures de 15—6 ^{0} C., ont une ressemblance plus grande avec la semence (Fig. 1, Pl. III).

Le Sacch. Pastorianus I, dans les cultures à 20—28 ^{0} C. (Fig. 1, Pl. IV), est assez semblable à la semence (Fig. 2, Pl. I); cependant les cellules sont en général plus petites et plus fluettes (dans la Fig. 1, quelques-unes des cellules allongées ne sont pas bien dessinées). Au-dessus de 15 ^{0} C., elles devenaient d'ordinaire plus grandes et plus vigoureuses, et à 13—15 ^{0} C. apparaissaient généralement des colonies fortement développées, ressemblant à du mycelium (Fig. 2, Pl. IV). Comme d'habitude, on a observé dans les différentes cultures de cette espèce, de même que des autres, quelque variation dans le rapport entre les cellules ovales et les cellules courtes en forme de boudin, d'une part, et les colonies ci-dessus mentionnées, de l'autre.

Chez le Sacch. Pastorianus II, les végétations à 20—28 ^{0} C. (Fig. 1, Pl. V) ressemblent aussi à la semence (Fig. 3, Pl. I); particulières sont seulement les cellules baroques en forme de boudin qui se développent ici assez souvent. A 15—3 ^{0} C., par contre, les végétations (Fig. 2, Pl. V) renferment en grande majorité des cellules rondes et ovales et ont ainsi perdu leur type pastorien.

Le Sacch. Pastorianus III a, nous l'avons vu, développé à 20—28 ^{0} C. des végétations qui, de même que les précédentes, ressemblent assez à la semence (comp. Fig. 1, Pl. VI, avec Fig. 1, Pl. II). Mais, à 15—3 ^{0} C., elles en diffèrent nettement par leurs colonies fortement développées de cellules allongées en forme de boudin et filiformes (Fig. 2, Pl. VI), par quoi elles se rapprochent beaucoup des cellules des vieux voiles de la Fig. 3. C'est cette espèce dont les colonies ont la plus grande ressemblance avec un vrai mycelium.

Le Sacch. ellipsoïdeus I, à 20—34 et 6—7 ^{0} C., a des cellules en forme de boudin plus petites et relativement plus nombreuses (Fig. 1, Pl. VII) que la semence (Fig. 2, Pl. II). A 13—15 ^{0} C. ses végétations se distinguent par leurs colonies richement ramifiées et fortement développées de cellules en forme de boudin courtes ou allongées, souvent avec des rameaux verticillés, complètement différentes de la semence et ressemblant aux vieilles cultures Fig. 3. C'est une des plus intéressantes métamorphoses que les expériences aient provoquées.

Dans le Sacch. ellipsoïdeus II, nous avons une espèce qui a cela de caractéristique que les cellules des voiles, dans les premières phases, ont à peu près la même forme à toutes les températures depuis 3 jusqu'à

38 ⁰ C. (Fig. 1 et 2, Pl. VIII), et en somme elles ressemblent également à celles de la semence (Fig. 3, Pl. II); elles sont seulement en général plus petites. A 15 ⁰ C. et aux basses températures, elles étaient peut-être un peu plus allongées qu'à des températures plus élevées.

Ces voiles du Sacch. cerevisiæ I, du Sacch. Pastorianus II et du Sacch. ellipsoïdeus II ne renferment pas les colonies fortement développées de cellules allongées ressemblant à du mycélium qui sont reproduites sur les Fig. 3 des planches correspondantes, et qui, on se le rappelle, représentent les voiles vieux de plusieurs mois cultivés dans des ballons Pasteur à la température ordinaire d'un appartement. C'est seulement après que la culture a été continuée plusieurs jours ou plusieurs semaines au-delà du temps indiqué dans les tableaux que ce développement se produit; il n'est par suite pas difficile de séparer ces deux phases l'une de l'autre. Par contre, des végétations ayant le même aspect que celles de ces vieilles cultures se trouvaient dès l'origine dans les voiles du Sacch. Pastorianus I et, à un plus haut degré encore, dans celles du Sacch. Pastorianus III et du Sacch ellipsoïdeus I. Chez toutes les espèces, une culture continuée pendant longtemps donne en général naissance à des végétations avec des cellules plus allongées, de sorte qu'apparaissent successivement pour chaque espèce les formes représentées sur les Fig. 3.

En s'approchant des températures limites, les végétations perdent de leur vigueur; tel est surtout le cas pour le développement aux températures plus élevées, où les cellules, au bout de très peu de temps, ont l'air d'être mortes. Des essais faits avec chaque espèce nous ont appris comment on peut, jusqu'à un certain degré, gouverner le développement et déterminer les changements de forme des cellules,

En considérant les six planches avec les végétations des membranes, on a aussitôt l'impression de se trouver en face d'un nombre aussi grand des levûres différentes; nous allons maintenant en faire une comparaison exacte et indiquer ensuite les principales différences.

Les Fig. 1 des planches IV, V, VI et VII ont entre elles une grande ressemblance; elles représentent, comme il a été dit plus haut, les trois espèces du groupe Pastorianus et le Sacch. ellipsoïdeus I. De ces figures se séparent assez nettement la Fig. correspondante 1, Pl. VIII, du Sacch. ellipsoïdeus II et la Fig. également correspondante 2, Pl. III, du Sacch. cerevisiæ I. Les végétations des voiles aux températures plus élevées ne nous sont donc que d'un faible secours pour distinguer les unes des autres de nos six espèces. Il en est tout autrement si nous considérons à leur origine les voiles qui se développent à 13—15 ⁰ C., et qui sont représentés Fig. 2, Pl. IV, V, VI, VII et VIII, et Fig. 1, Pl. III; ils nous montrent des différences frappantes entre plusieurs de ces espèces. Il est particulièrement important pour nous que le Sacch. Pastorianus II et le Sacch. Pastorianus III, qui tous deux sont des formes de fermentation haute, et dont les cellules de la semence (Fig. 3, Pl. I et Fig. 1, Pl. II) ne peuvent avec certitude être distinguées l'une de l'autre, apparaissent ici avec des végétations entièrement différentes (Fig. 2, Pl. V

et Fig. 2, Pl. VI); il en est de même des Saccharomyces ellipsoïdeus I et II, dont les cellules de la semence sont similaires. (Comp. Fig. 2, Pl. VII avec la Fig. 2 correspondante, Pl. VIII).

En joignant un examen microscopique des cellules semées à un examen analogue des cellules des voiles, nous pourrons donc déterminer nos six espèces par la forme des cellules. Il ne se présente de veritables difficultés que lorsqu'il s'agit de distinguer le Sacch. Pastorianus I et le Sacch, Pastorianus II; il faut alors, dans les cas douteux, s'aider d'autres caractères. On se rappellera, d'après mes recherches antérieures, que la température maximum pour le développement des ascospores est un peu plus élevée chez le Sacch. Pastorianus I que chez le Sacch. Pastorianus II, et que le premier est une forme de fermentation basse, le second, au contraire, une forme de fermentation haute.

Les indications de temps dans les tableaux précédents ont seulement pour but de donner une idée approximative du temps qui s'écoule aux différentes températures avant l'apparition de formations macroscopiques distinctes de voiles. L'indiquer d'une manière tout à fait exacte n'est par la nature même des choses guère possible. Déjà dans l'écume qui se forme au commencement de la fermentation apparaissent les cellules de levûre, dont la multiplication, à mesure que l'écume disparaît, couvrira plus tard, plus ou moins vite ou lentement, la surface du liquide d'un voile; il n'y a pas de limites bien marquées dans la marche de ce développement, et les séries d'essais faites avec les mêmes espèces donnent aussi à cet égard des résultats un peu différents. D'un plus grand intérêt sont pour nous les températures minima et maxima, qui, comme le montrent les tableaux, sont différentes pour les différentes espèces. D'après ces minima et ces maxima, nos six espèces se laissent diviser en trois groupes.

En comparant les limites de températures trouvées dans mes recherches sur les ascospores avec celles dont il s'agit, on voit qu'elles sont différentes chez la même espèce. Le développement des ascospores et la formation des voiles ont cependant cela de commun, qu'ils dépendent tous deux des températures en ce sens que, dans les limites où ils peuvent avoir lieu, ils se produisent plus lentement aux basses températures et plus rapidement aux températures plus élevées. Aux températures voisines des minima et des maxima, le développement des voiles était toujours très faible, et elles ne couvraient jamais toute la surface du liquide.

Aux températures supérieures à 13^0 C. le Sacch. ellipsoïdeus II avait toujours le développement le plus rapide et le plus marqué, et c'était si frappant que, par là seulement, on pouvait toujours parmi les autres flacons reconnaître ceux qui renfermaient cette espèce; mais, aux températures inférieures à 13^0 C., il était un peu en arrière du Sacch. Pastorianus III. Un voile complet s'étendant comme une couche épaisse sur toute la surface du liquide s'est, chez le Sacch. ellipsoïdeus II par ex., formé au bout de 6—12 jours à 22—23^0 C., tandis que cette formation, chez les cinq autres espèces, exigeait plus du triple de ce temps,

en tant toutefois qu'elles se développaient avec la même énergie. A la chaleur ordinaire d'un appartement avec la température variable des différentes heures du jour, cette espèce se distinguait également par le développement rapide et vigoureux de son voile. Cependant, aux basses températures dont il s'agit, surtout pendant la nuit, le développement était plus lent qu'à la température ci-dessus mentionnée, et le Sacch. Pastorianus III pouvait rivaliser avec elle. Dans les recherches qui précèdent, nous ne nous sommes occupé que des formations de voiles à la surface même du liquide, et avons laissé de côté les végétations qui se développent au-dessus de ce dernier sur les parois mêmes du verre. Pour plus de détails, voir le texte danois, p. 185.

On voit par les tableaux p. 114—115 que la formation des voiles chez le Sacch. cerevisiæ I et le Sacch. ellipsoïdeus I s'arrête dans le voisinage de 38 et, chez le Sacch. ellipsoïdeus II, aux environs de 40 ^{0} C., tandis que, chez les trois espèces du groupe Pastorianus, cet arrêt a lieu déjà au-dessous de 34 ^{0} C. Ce fait est en connexion avec ce que j'ai indiqué dans un mémoire antérieur, à savoir que les températures maxima pour le bourgeonnement ne sont pas les mêmes pour les differentes espèces. Mais le bourgeonnement et la fermentation ont lieu au-dessus de la température à laquelle aucun voile ne peut se développer. Il résulte du texte danois (p. 186) qu'on s'est trompé en croyant pouvoir établir la règle que les levûres de fermentation haute peuvent se développer à des températures plus élevées que les levûres de fermentation basse. Inversement, il y a des levûres de fermentation haute qui, à de basses températures, se développent avec plus d'énergie que certaines levûres de fermentation basse (par ex. le Sacch. Pastorianus II et le Sacch. Pastorianus III en opposition au Sacch. ellipsoïdens I). D'après les points de vue que nous venons d'exposer, et qu'on trouvera plus développés dans le texte danois, nous pouvons diviser nos six espèces en deux groupes, et nous apprenons que les espèces qui ont les températures maxima les plus hautes pour le bourgeonnement et la fermentation, les ont aussi pour la formation des voiles.

En examinant la levûre de dépôt provenant des cultures faites dans les flacons et décrites plus haut, j'ai observé que, dans la plupart des cas, elle avait l'aspect pâteux ordinaire des masses de levûre, mais que, dans d'autres cas, elle formait au fond du flacon une couche membraneuse froncée. Tel était le cas pour le Sacch. Pastorianus II et le Sacch. Pastorianus III. Chez le premier, elle etait cependant pâteuse à la plupart des températures et, en général, ne devenait membraneuse qu'au-dessous de 7 ^{0} C.; chez le second, il se développait de la levûre de dépôt pâteuse dans les cultures faites aux températures comprises entre

35 et 22 ° C., après quoi elle commençait à devenir membraneuse et froncée et, entre 14 et 1 ° C., cette forme était très marquée.[1])

La levûre de dépôt membraneuse, chez les deux formes de fermentation haute précitées, se composait principalement de colonies fortement développées ressemblant à du mycelium, et présentait par suite au microscope une image bien différente de celle de la semence. En prolongeant les cultures un temps suffisant, j'ai constaté que les cellules de levûre de dépôt des espèces différaient dans plusieurs cas de celles de la semence, et qu'il était aussi possible, par cette voie, d'obtenir des caractères morphologiques et physiologiques. En faisant des essais de cultures sur un substratum solide à de hautes températures, j'ai eu l'occasion de faire des observations analogues. Ces études nous ont ainsi fourni une nouvelle preuve de l'influence qu'exercent les températures. La même espèce, sous une influence extérieure variable, peut se comporter d'une manière toute différente et présenter un tout autre cachet; mais, réciproquement, on trouve aussi que l'influence dont il s'agit a des limites et que nos six espèces réagissent d'une manière différente, preuve qui il y a des facteurs internes, inhérents aux cellules, qui exercent leur action.

Un des résultats pratiques de mes études sur les levûres alcooliques consiste en ceci, qu'elles ont conduit au développement d'une méthode pour les analyses de la levûre des brasseries. C'est en grande partie sous l'influence de la pratique elle-même que mes travaux ont été entrepris. Lorsque, il y a environ dix ans, je commençai à travailler pour les grandes brasseries de Carlsberg et fus, en particulier, chargé d'analyser la levûre et d'en suivre le développement pendant la fermentation, je sentais souvent combien se réduisait à peu de chose ce qu'on pouvait faire dans ce domaine. L'analyse, telle qu'elle était alors possible, se bornait à rechercher si la levûre renfermait ou non des bactéries et des moisissures. Je remarquai bien assez vite que, dans la masse même de la levûre et dans ces cellules de Saccharomyces en apparence identiques, devaient se cacher de grands et importants secrets, et que c'était juste ment là qu'il fallait porter l'attaque, mais la littérature existante ne donnait aucun éclaircissement à ce sujet. Mon travail n'aboutissant à aucun résultat et l'exploitation de la brasserie me posant tous les jours des questions à résoudre, je ne tardai pas à voir que je devais ou me frayer une nouvelle voie ou me retirer. Je résolus donc d'essayer dans la

---

[1]) La note p. 187 du texte danois explique comment l'aspect de la levûre de dépôt, du moins dans certains cas, dèpend du mode de culture auquel l'espèce de levûre avec laquelle on opère est soumise. On peut par là obtenir une levûre pâteuse, membraneuse et caséeuse. La clarté et la couleur du liquide fermenté sont en connexion étroite avec ces variations dans la levûre.

mesure de mes forces. Bien que je n'aie pas trouvé dans la littérature ce que j'y cherchais, il va cependant sans dire qu'elle ne m'a pas été inutile, et sans les importants travaux de MM. Pasteur et Reest, en particulier, je n'aurais guère été en état de résoudre le problème.

Comme point de départ de mes recherches, je pris une masse de levûre basse qui, d'après les données existantes, devait se composer d'une seule espèce, le Sacch, cerevisiæ, et être regardée comme pure et exempte de tout mélange étranger. Je partis de l'hypothèse que ces cellules en apparence identiques pouvaient peut-être appartenir à plusieurs espèces, et que, le cas échéant, je pourrais bien aussi découvrir entre elles des caractères distinctifs. Pour éclaircir ces questions, j'exécutai d'abord une nombreuse série de cultures, chacune avec l'ensemencement d'une seule cellule d'après les méthodes communiquées dans mon mémoire précédent (p. 92 et suiv.), et, avec ces cultures pures, j'ai ensuite expérimenté de diverses manières.

Le premier point de repère que j'ai découvert a été la marche du développement des ascospores chez les Saccharomyces. Le mémoire de mes aides, MM. Holm et Poulsen [1]), montre que les résultats obtenus, lorsqu'ils sont employés comme il convient dans l'analyse pratique, non seulement la rendent sûre, mais lui donnent en même temps un grand degré de finesse.

De là se sont développées comme d'elles-mémes mes études sur les maladies de la bière provoquées par des ferments alcooliques, ainsi que des méthodes pour un choix systématique de races déterminées dans les cultures purès à l'usage de la grande industrie.

Tous ces travaux, qui, tout en étant rigoureusement scientifiques, ont cependant été executés directement en vue de la pratique, conservent ou perdent leur valeur avec la supposition que les Saccharomyces constituent des espèces, des variétés ou des races, ou, en d'autres termes, que les caractères découverts par moi sont constants. Comme nous avons souvent eu l'occasion de le constater, la définition de l'espèce, telle qu'elle est exposée dans le système de M. Reess, est erronée, et M. Pasteur ne s'est, à cet égard, placé à aucun point de vue déterminé. Une question de cette nature ne pourra naturellement être tout à fait éclaircie que par des expériences méthodiques poursuivies pendant des années aves des cultures absolument pures. Ce sont de pareilles recherches qui, pour la première fois, ont été entreprises par moi.

La question fondamentale que nous venons de soulever n'est pas encore résolue, mais les essais pratiqués jusqu'ici nous ont appris que les Saccharomyces comprennent des formes avec un haut degré de constance, et que tout indique qu'il se trouve dans ce genre des espèces aussi bien caractérisées que chez les champignons supérieurs. Ces ré-

---

[1]) Holm et Poulsen: Jusqu'à quelle limite peut-on, par la méthode de M. Hansen, constater une infection de »levûre sauvage« dans une masse de levûre basse de Saccharomyces cerevisiæ? (Résumé du compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg, II Vol. 4 Liv. 1886, pag. 88).

sultats ont aussi été confirmés par mes études sur les voiles, que j'ai communiquées plus haut. Je me propose, dans un travail ultérieur, de déterminer d'une manière p'us précise que cela n'a eu lieu jusqu'ici le rôle qu'elles doivent jouer dans la méthode analytique.

Après que les races cultivées par moi à l'état de pureté eurent été introduites dans la pratique de la grande industrie tant à l'étranger qu'en Danemark, on a pu, dans des conditions souvent très différentes de cultures, faire des observations importantes quoique sans y apporter tout à fait la même rigueur scientifique qu'au laboratoire. Dans la plupart des cas, les praticiens aussi bien que les thèoriciens ont porté un jugement favorable sur mes innovations, mais les attaques n'ont pas manqué non plus. A la tête de mes adversaires s'est mis M. le professeur Dr. Delbrück, directeur de la station d'essais, à Berlin. S'appuyant en partie sur les doctrines de M. Nägeli, il s'est élevé contre mes essais pour introduire dans l'industrie des cultures pures de certaines races choisies, et a mis en garde contre ma méthode botanique. M. le Dr. Hayduck, chimiste distingué, s'est joint à lui et a soulevé la question si la levûre de bière comme levûre basse comprend ou non différentes races douées de propriétés constantes. D'après la manière de voir encore généralement admise, il désigne toute levûre basse comme une espèce et croit que les différences qu'elle peut présenter sont d'une nature purement passagère sans constance, de sorte qu'elles s'effacent facilement et rapidement dans d'autres conditions de culture. C'est en réalité la même doctrine que, dans ce domaine, on trouve chez les naturalistes les plus renommés, et qui de là s'est propagée dans des écrits et des cours populaires. Dans les derniers temps, elle a reçu une espèce d'appui dans les théories bactériologiques de M. Nägeli. Jusqu'en 1881, entrainé par le courant universel, j'ai aussi partagé cette opinion, comme on peut le voir en plusieurs endroits dans mes mémoires publiés jusqu'alors, et ce n'est qu'après avoir entrepris une grande série d'essais originaux que j'ai vu les choses d'un autre œil. Le résultat auquel je suis arrivé sur ce point peut s'exprimer comme il suit: L'idée qui a été attachée jusqu'ici dans la littérature au nom systématique de Sacch. cerevisiæ (forme de levûre basse) est erronée; car, sous ce nom, sont comprises non pas une, mais plusieurs formes morphologiquement et physiologiquement différentes, auxquelles on pourrait donner des noms spécifiques particuliers avec autant de droit qu'aux espèces de levûres sauvages appelées Sacch. Pastorianus, Sacch. ellipsoïdeus, etc. Ces formes peuvent être distinguées les unes des autres par des caractères déterminés, et elles ont au moins un haut degré de constance.[1])

[1]) Dans un mémoire antèrieur, j'ai déjà fait remarquer, relativement à la question dont il s'agit, qu'il ne peut pas encore être question de décider ce que, chez les Saccharomyces, il faut appeler espèce, variété, race ou modification. C'est pourquoi je n'ai pas non plus voulu introduire dans le présent mémoire de nouveaux noms systématiques. Mais pour pouvoir parler de ces objets, il sera difficile d'éviter l'emploi de désignations comme

Tout en continuant jusqu'à plus ample informé à nous servir des anciens noms systématiques, nous devons faire observer que nous n'avons pas le droit d'y attacher les idées qui les accompagnaient jusqu'ici. C'est ce que M. le Dr. Hayduck a fait. Il s'est servi dans ses recherches d'une levûre basse qui, d'après l'ancienne méthode, pouvait être considerée comme formée de Sacch. cerevisiæ à l'état de pureté, et rempli de l'idée qu'il devait n'y trouver qu'une espèce, il l'a traitée comme telle sans chercher, comme moi, à la décomposer en ses éléments éventuels.

Les attaques de mes honorés collègues de Berlin ont eu pour résultat que mes travaux ont, de divers côtés, été soumis à un examen, et elles ont provoqué en faveur de ma cause plusieurs excellents écrits.[1]) Elle a aussi en somme été favorablement jugée dans l'assemblée générale tenue à Berlin en avril 1885. La dispute n'est pas close, mais est entrée provisoirement dans une phase plus tranquille, et l'opinion générale à ce sujet a certainement trouvé son expression dans le court résumé suivant qu'en a donné M. le professeur Dr. Lintner sen., le célèbre auteur zymotechnique bavarois: [2])

Après que plusieurs brasseries ont employé les races de levûres cultivées à l'état de pureté de Carlsberg, et que la station scientifique de Munich a introduit dans les brasseries des races de Munich cultivées à l'état de pureté, les faits observés peuvent se résumer dans les points suivants:

---

espèce ou race; ces mots signifient seulement alors qu'il s'agit d'organismes qui, sous un rapport ou sous un autre, se distinguent les uns des autres par des caractères constants.

[1]) Je n'ai pas jusqu'à présent pris part moi-même à cette dispute; les principaux articles publiés à cette occasion sont dus à MM.:

Delbrück (Wochenschrift für Brauerei. Berlin 1885, p. 126).

Hayduck (Même revue, p. 314).

J. C. Jacobsen (Même revue, p. 126, et Zeitschrift für das ges. Brauwesen. Munich 1885, p. 117).

Aubry (Zeitschrift für das ges. Brauwesen. Munich 1885, p. 133 et pag. 237).

Bĕlohoubek (Der Böhmische Bierbrauer. Prague 1885, p. 498).

Alfred Jörgensen (Allgem. Zeitschr. für Bierbrauerei und Malzfabr. Vienne 1885, p. 489 et suiv., p. 609 et suiv. Allgem. Brauer- und Hopfenzeitung. Nüremberg 1885, p. 359, et le numéro du jubilé).

Thausing (Allgem. Zeitschr. für Bierbrauerei und Malzfabr. Vienne 1885, p. 755).

Will (Allgem. Brauer- und Hopfenzeitung. Nüremberg 1785, le numéro du jubilé).

Louis Marx (Revue universelle de la brasserie et de la malterie. Paris et Bruxelles 1885, No. 622).

[2]) C. Lintner, Zymotechnische Rückblicke auf das Jahr 1884 (Zeitschr. für das ges. Brauwesen. Munich 1885, p. 399).

1. Par l'infection des levûres dites »sauvages«, une levûre de brasserie d'ailleurs normale peut être mise hors d'état de produire une bière de bon goût et pouvant se conserver.

2. Une pareille infection peut être produite par les levûres sauvages contenues pendant l'été et l'automne dans les poussières de l'air, comme aussi par la drêche ou par d'autres levûres.

3. En employant les méthodes de cultures pures et d'analyse de M. Hansen, on peut d'une pareille masse de levûre infectée retirer une bonne levûre brasserie à l'état de pureté, telle qu'on la désire.

4. La levûre cultivée à l'état de pureté jouit à un haut degré des propriétés qu'avait la levûre primitive avant qu'une telle culture devînt nécessaire, tant en ce qui concerne la degré de l'atténuation que le goût et la conservation de la bière.

5. Il existe différentes races de la levûre basse normale de bière (Sacch. cerevisiæ), chacune avec des propriétés spéciales qui, comme particularités de races, se maintiennent constantes.

Que je voie très bien moi-même ce qui manque encore avant que mon édifice puisse être regardé comme élevé, c'est ce qui ressort des nouvelles recherches que je viens d'exposer. Le compte rendu qui précède servira à éclaircir les idées sur la position de mes travaux, surtout en ce qui concerne les questions fondamentales ci-dessus mentionnées, et à dissiper les malentendus qui se sont produits.

En connexion avec le développement des voiles sont les transformations chimiques qui s'opèrent au-dessous dans la sein du liquide. et qui se manifestent entre autres par une décoloration. La bière produite à la fin de la fermentation principale et brun foncé comme le moût employé dans l'expérience, et on ne découvre pas grande différence dans la couleur. Il en est tout autrement lorsque la bière est restée plus ou moins longtemps en repos, et que la surface en est recouverte d'un voile. Ce changement de couleur peut être très marqué, le liquide originairement brun foncé pouvant même devenir jaune clair. J'ai observé souvent cette décoloration, non seulement chez mes six espèces mentionnées plus haut, mais aussi chez les nombreux Saccharomyces avec lesquels j'ai expérimenté dans le cours des années, et elle se produit aussi, mais peut-être pas chez toutes les espèces, chez les cellules de levûre qui ne peuvent pas développer de spores endogènes.

Dans les essais faits à la température du laboratoire, cette décoloration est surtout très frappante dans les cultures du Sacch. ellipsoïdeus II et du Sacch. Pastorianus III, les deux espèces qui, dans les conditions données, développent régulièrement les voiles les plus forts. De même que la formation des voiles, la décoloration a lieu plus vite à de hautes qu'à de basses températures; c'est ainsi qu'elle était déjà très apparente

au bout de 7 jours dans les cultures décrites plus haut du Sacch. ellipsoïdeus II, aux températures comprises entre 26 et 35° C.

Cette décoloration rappelle beaucoup celle que les Saccharomyces peuvent provoquer dans d'autres circonstances, et dont j'ai dit quelques mots dans la note p. 120.[1])

Dans mes recherches sur les voiles, j'ai spécialement observé si leurs cellules développaient ou non des ascospores, et suis arrivé à ce résultat que cela n'a lieu que tout exceptionnellement lorsque le liquide nourricier est du moût de bière; car, bien que, pendant le temps considérable qu'ont pris les essais décrits plus haut, j'aie examiné un très grand nombre de préparations, ce n'est cependant que dans un seul cas que j'ai constaté la présence de quelques cellules avec ces organes de multiplication, et encore n'appartenaient-elles pas au voile, mais à la ceinture de levûre qui s'était étendue sur la paroi du ballon au-dessus de la surface du liquide. Il en était tout autrement des essais mentionnées p. 195 du texte danois, où, au lieu de moût, on employait comme liquide nourricier une décoction d'eau de levûre. De ces observations, on peut certainement tirer la conséquence, que les ascospores ne se produisent pas là où une fermentation de sucre peut avoir lieu, ni en général non plus lorsque le développement du voile est très marqué.

En 1879, M. Schmitz a découvert chez le Sacch. cerevisiæ (levûre de bière) des corps qu'il considère comme des noyaux cellulaires. D'après lui, il y a dans chaque cellule un noyau sphérique qui est logé dans le plasma environ au centre de la cellule. Il a également trouvé ces noyaux chez le Mycoderma vini dans des conditions analogues. En employant la méthode de préparation indiquée par M. Schmitz, j'ai observé des corps analogues chez les Saccharomyces suivants: levûre basse n° 1 de Carlsberg, levûre haute de Burton, Sacch. Pastorianus I et Sacch. Pastorianus II. Seulement j'ai constaté, du moins dans quelques cas, qu'ils n'étaient pas sphériques, comme l'indique M. Schmitz, mais discoïdes; ils n'étaient pas non plus, dans la règle, placés au centre de la cellule, mais tout aussi souvent à l'une de ses extrémités. Ayant eu l'occasion, il y a quelques années, d'aborder cette question avec M. le professeur Schmitz, nous finîmes par conclure, après avoir comparé nos préparations, que mes

[1]) J'ai communiqué, p. 193—195 du texte danois, quelques observations sur l'influence que la composition chimique du liquide nourricier a sur le développement des voiles et sur la forme des cellules qui les composent.

corps colorés en bleu étaient les mêmes que ceux qu'il avait découverts, Dans un de ses mémoires, il fait lui-même remarquer que le noyau, chez la même cellule, peut affecter différentes formes dans les différentes phases du développement; dans les jeunes cellules il est souvent sphérique, tandis que dans les cellules âgées. il devient discoïde avec un contour arrondi ou irrégulier. Bien que. dans ce passage, il ne soit pas question de cellules de levûre, je suppose cependant que là se trouve l'explication de la différence entre les observations de M. Schmitz et les miennes. Plus tard j'ai constaté qu'en traitant les cellules de levûre par l'acide osmique, et en les mettant ensuite dans de la glycérine diluée, on obtenait plus facilement des préparations tout aussi bonnes que les précédentes. Pour les recherches de MM. Zalewski et Krasser voir p. 197 du texte danois.

Dans le cours de mes expériences, j'ai également eu plusieurs fois l'occasion d'observer ces noyaux dans les cellules des voiles chez le Sacch. pastorianus I, le Sacch. Pastorianus II et le Sacch, ellipsoïdeus I, sans entreprendre aucune coloration, mais seulement en mettant les cellules en question dans une préparation microscopique ordinaire, dans un peu d'eau ou dans le mélange de glycérine de Hantsche. Je les ai trouvés dans les vieilles cultures mentionnées plus haut des ballons Pasteur faites à la température ordinaire d'un appartement, et de même dans des cultures faites dans des flacons à 14—6 ^{0} C. Si leur apparition dans les voiles est limitée aux conditions et aux espèces indiquées ci-dessus, c'est ce que je ne saurais décider, comme je n'ai pas entrepris de recherches spéciales en vue de cette question.

Dans ce qui précède, les voiles des Saccharomyces ont été étudiés à différents points de vue; il nous reste encore à parler du mucilage qui se développe entre les cellules.

C'est un fait connu de tous les brasseurs que les cellules de levûre, au sein de la bière en fermentation. peuvent, sous certaines conditions encore inconnues, se réunir en amas irréguliers qui avec une facilité relative tombent au fond, de sorte que le liquide qui est au-dessus devient clair. On a prêté une grande attention à ce phénomène, et il est souvent mentionné dans les écrits tant scientifiques que techniques qui traitent de la levûre, mais on n'a pas encore réussi à l'expliquer. En soumettant la levûre de bière ordinaire à un traitement chimique, on a bien obtenu un hydrate de carbone, appartenant aux mucilages végétaux, qui est supposé provenir de la membrane des cellules, mais jusqu'ici il n'a pas été possible de résoudre cette question essentielle. On a également, pendant longtemps, vainement cherché avec le microscope des formations mucilagineuses chez les cellules de levûre. C'est seulement en 1884 que j'ai réussi à en découvrir (Botan. Centralblatt, B. XXI No. 6). J'ai plus tard poursuivi ces recherches, et en communiquerai ici en peu de mots les principaux résultats. Chez les Saccharomyces et des cellules de levûre

de plusieurs espèces qui ne développent pas de spores endogènes. il peut, sous certaines conditions, se produire des formations qui se présentent comme un réseau gélatineux composé de cordes ou de lames. Dans les mailles ou les vides de ce réseau sont logées les cellules. Les granulations qui se trouvent à l'origine entre celles-ci peuvent devenir partie intégrante du réseau, comme aussi lui donner une coloration. De même que le plupart des membranes gélatineuses, ce réseau n'est pas coloré en bleu par l'iode. Un moyen facile de l'obtenir consiste à mettre un amas de levûre épaisse, comme il y en a ordinairement dans les brasseries, dans un bocal qu'on recouvre ensuite et laisse quelque temps en repos. Il apparaît pendant que la levûre est encore suffisamment humide, mais ne se forme pas si le dessèchement est trop rapide. On l'observe généralement dans les cultures d'ascospores sur des blocs de plâtre et sur la gélatine. D'après une communication verbale de M. Alfred Jörgensen, ce réseau s'est aussi fréquemment montré dans les nombreuses préparations de levûre dans du papier à filtrer qui, dans les dernières années, ont de divers côtés été envoyées à son laboratoire.[1]) Ce n'est pas non plus un phénomène rare dans la pratique.

J'ai observé assez souvent cette formation de réseau chez le Sacch. cerevisiæ I, le Sacch. Pastorianus I, le Sacch. Pastorianus II, le Sacch. ellipsoïdeus I et le Sacch. ellipsoïdeus II, tant dans les voiles que surtout dans la ceinture de levûre qui se développe sur les parois des ballons, et aussi bien à de hautes qu'à de basses températures. J'ai lieu de croire qu'en poursuivant cette recherche dans les mêmes circonstances, on la trouvera aussi chez le Sacch. Pastorianus III: je l'ai en tout cas rencontrée plusieurs fois dans mes essais avec la levûre de dépôt de cette espèce.

Dans mes expériences sur la levûre ordinaire de mise en levain provenant des cuves de fermentation, j'ai constaté comme d'habitude qu'un examen microscopique des cellules dans cet état ne pouvait faire découvrir trace du réseau dont il s'agit ni, en général, de formations mucilagineuses. En produisant ensuite des colorations d'après plusieurs des méthodes ordinairement employées en bactériologie, le réseau a apparu très distinctement et sous une très jolie forme. La préparatiou microchimique durcit la masse mucilagineuse, qui prend alors une forme déterminée. Tandis que les cellules mêmes se colorent fortement, le réseau ne reçoit aucune coloration ou seulement une faible teinte. En procédant à un grand lavage, on peut obtenir une masse de levûre qui, traitée par les méthodes de coloration ci-dessus mentionnées, ne montre plus de réseau. Mais débarrasse-t-on les cellules de leur eau et les laisse-t-on reposer quelque temps, la masse mucilagineuse peut se reproduire et le réseau reparaître si la préparation est convenablement faite. Cela s'applique aussi aux nouvelles générations qu'on obtient en semant dans du moût les vieilles cellules lavées.

---

[1]) Sur cette manière commode de préparer de la levûre qui doit être envoyée au dehors et conservée pendant longtemps, on trouvera des renseignements dans mon mémoire cité plus haut sur la formation des ascospores, chapitre des méthodes, p. 29.

Comme on devait s'y attendre, cette formation mucilagineuse dépend de l'alimentation des cellules, en ce sens qu'en variant celle-ci on peut l'activer ou l'arrêter et exercer une action sur sa composition chimique.

Les questions dont il s'agit seront traitées avec détail dans un mémoire spécial accompagné des figures nécessaires, et qui donnera aussi des renseignements sur les rapports existant entre cette formation mucilagineuse et ce qu'on appelle *Zooglœes* chez les bactéries.

CONTRIBUTIONS DE MES PRÉDÉCESSEURS À LA CONNAISSANCE DE LA FORMATION DES VOILES CHEZ LES SACCHAROMYCES.

Les premières indications sur cette espèce de végétations se trouvent dans l'ouvrage remarquable pour l'époque de M. Reess, «Botanische Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze», 1870. Tandis que chez lui la description morphologique est la chose principale, l'expérimentation, chez M. Pasteur, occupe toujours le premier rang; c'est en somme, comme on sait, de ce éminent savant que date l'étude expérimentale moderne des microorganismes. Il a également donné des contributions à la principale question qui est traitée dans le présent mémoire.

Dans l'ouvrage souvent cité par moi, «Études sur la bière» 1876, se trouve, p. 201, une communication sur «un nouveau genre de levûres alcooliques, les levûres aérobies ou levûres-moisissures». M. Pasteur a remarqué qu'à la surface du liquide qui avait été le siège d'une fermentation alcoolique et abandonné ensuite longtemps à lui-même, il se formait un voile mycodermique ou, tout autour du bord de cette surface, une ceinture de levûre. C'est cette végétation de lévûre, observée par lui surtout dans la bière et des liquides nourriciers analogues, qu'il désigne sous les noms ci-dessus. Le développement le plus marqué et le plus rapide se produisait là où l'air avait le plus libre accès. De ces levûres aérobies, il est dit, p. 205, que, bien quelles ressemblent aux formes de la levûre d'origine, du moins en apparence, elles ne leur sont cependant pas identiques. «Dans la plupart de mes expériences», ajoute M. Pasteur, «j'ai vu la nouvelle levûre aérobie se comporter comme une levûre haute, montant à la surface, et donnant une bière qui a quelque chose de plus parfumé que la bière de la levûre basse dont elle émane. Enfin les propriétés d'une levûre aérobie ne sont pas propres à une première culture, elles sont héréditaires.» A la page 213, M. Pasteur soulève la question si la levûre haute employée dans l'industrie n'est pas la forme de levûre aérobie de la levûre basse, et ajoute: Je serais disposé à croire que la levûre que j'ai appelée nouvelle levûre haute pourrait bien être la levûre aérobie de la levûre basse des brasseries alsaciennes ou allemandes.» Mais plus en arrière dans son livre, p. 189, il est par la voie expérimentale arrivé à un autre résultat, à

savoir que la levûre haute et la levûre basse sont deux espèces différentes qui ne passent pas de l'une à l'autre; cependant l'idée que le contraire pourrait quand même être le cas l'a évidemment dominé de plus en plus pendant la rédaction de l'ouvrage. C'est ainsi que, à propos de la mise en levain (p. 333. note), il y revient encore. Il y donne en effet aux brasseurs une recette quant à la manière dont ils doivent traiter leur levûre basse, s'ils veulent empêcher qu'elle ne soit transformée en levûre haute par le développement de la levûre aérobie.

De ce qui précède, nous devons conclure que c'est l'opinion de M. Pasteur que «le nouveau genre de levûre» est une forme de développement de la levûre de dépôt ordinaire. Mais. dans la note p. 205, il exprime quelques doutes à cet égard et admet la possibilité que les formes de la levûre aérobie se soient trouvées à l'état de mélanges cachés dans masses de levûre avec lesquelles les expériences ont été faites. Il donne des raisons pour et contre cette manière de voir, sans pourtant arriver à résoudre ce point si important.

D'après M. Pasteur, les cellules de la levûre aérobie ont essentiellement la même forme que les cellules qui ont servi à l'ensemencement et que celles de la levûre de dépôt correspondante; la levûre aérobie de la levûre haute doit par conséquent, dans tous les cas, avoir des cellules rondes, etc. Par contre, il indique que les formations de voiles chez les diverses espèces, ont un aspect différent. Chez le Sacch. Pastorianus, la levûre aérobie forme à la surface du liquide, dans le voisinage de la paroi du ballon, un anneau qui se défait à la moindre secousse. La levûre aérobie de la levûre haute se montre sous forme de petits mamelons isolés à la surface du liquide fermenté. La levûre aérobie de la levûre basse forme une couche non cohérente qui, à la moindre secousse, tombe au fond comme une pluie de petites parcelles irrégulières, sans cependant troubler le liquide. Quant à la levûre aérobie de la levûre caséeuse, elle doit être caractérisée par la formation d'un voile épais, onctueux et continu, mais qui, de même que le précédent, se sépare en fragments lorsqu'on secoue le ballon.

Voilà, dans tous les points essentiels, ce que M. Pasteur a communiqué sur la levûre aérobie. En comparant avec ces résultats mes études précédentes sur les voiles des Saccharomyces, on a tout d'abord l'impression que ce sont probablement les mêmes phénomènes dont il est question; mais un examen plus attentif fait apercevoir de grands désaccords et naître des doutes à cet égard.

Le premier point que nous examinerons est l'assertion émise par M. Pasteur, que la levûre basse est aussitôt transformée en levûre haute par le développement de la levûre aérobie, et que les nouvelles propriétés ainsi acquises ne sont pas temporaires mais héréditaires. Pour résoudre cette question, j'ai entrepris un grand nombre d'expériences tant avec mes six espèces nommées plus haut qu'avec une race de levûre basse retirée d'une bière attaquée du trouble de la levûre[1]), la levûre basse nº 1

[1]) Emil Chr. Hansen. Maladies provoquées dans la bière par des ferments alcooliques (Résumé du compte rendu des travaux du Laboratoire de Carlsberg, II Vol. 2 Liv., 1883, p. 52 et suiv.).

de Carlsberg et enfin une espèce de levûre que j'appellerai dès à présent Sacch. exiguus, et sur laquelle je donnerai des renseignements plus détaillés dans un mémoire spécial. J'ai expérimenté aussi bien sur des voiles de formation récente que plus âgés, tous développés dans des cultures de moût à la température du laboratoire, par conséquent dans des conditions qui, autant que j'en puis juger, étaient les mêmes que celles dans lesquelles M. Pasteur opérait. Les ballons employés étaient en partie du modèle Pasteur, en partie du modèle Chamberland. Le voile formé par chacune des espèces ci-dessus mentionnées a servi à infecter un nouveau moût stérilisé, et j'ai ainsi comme auparavant toujours travaillé avec des cultures pures. Mes expériences peuvent se diviser en deux groupes. Dans l'un, les cellules semées non seulement dans les premiers ballons, mais aussi dans tous les suivants, provenaient toutes de végétations de voiles. En d'autres termes, un ballon *a* infecté avec une de ces végétations mycodermiques était abandonné à lui-même jusqu'à ce qu'il s'y fût développé un voile; avec ce voile on infectait le ballon *b*, dont le voile une fois formé servait à infecter la ballon *c*, etc. L'infection était donc constamment due aux voiles de formation nouvelle qui étaient transportés d'un ballon dans un autre jusqu'au dernier d'une longue série. Dans le deuxième groupe, au contraire, l'infection ne provenait d'un voile que dans le premier ballon de chaque espèce. Avec la levûre de dépôt qui s'y formait et avant que le voile s'y fût développé, on infectait le second ballon, et avec la levûre de dépôt de ce dernier, le troisième ballon, etc. L'infection, dans tous les ballons de chaque série de ce groupe, à l'exception du premier, était donc due à une levûre de dépôt. Les deux groupes d'expériences ont été exécutés à la température du laboratoire et à 26° C., en un mot dans des conditions qui, autant que nous sachions, doivent être regardées comme favorables pour provoquer des phénomènes de fermentation haute. Mais ils ne se sont cependant manifestés que dans les cas où les cellules semées à l'origine appartenaient à une forme de levûre haute. **Les voiles de toutes les six espèces de levûres basses n'ont toujours développé que de la levûre basse.**

Au cas que la levûre aérobie de M. Pasteur soit identique avec ma formation de voile, et qu'il ne se cache pas là-dessous quelque phénomène à moi inconnu, je dois supposer que la levûre basse dont il s'est servi pour ses expériences était mélangée de levûre haute. Comme il relève expressément que les transformations observées n'étaient pas d'une nature passagère, on ne saurait admettre qu'il se soit laissé tromper par cette particularité des Saccharomyces, qu'ils peuvent, après un certain traitement, produire pendant quelques fermentations des phénomènes de fermentation haute, après quoi ils reviennent à l'état normal. Ce n'est pas seulement au laboratoire, mais aussi dans les brasseries qu'on peut observer de pareils phénomènes (voir le texte danois, p. 203). Réciproquement, on peut exercer sur des formes types de levûre haute une action telle, que, pendant plusieurs générations, elles se comportent comme de la levûre basse; mais, dans ces cas aussi, cette transformation n'est que passagère.

Suivant M. Pasteur, les cellules de la levûre aérobie ne sont guère sujettes à variation, et sont, quant à la forme, semblables aux cellules

de la semence et à la levûre de dépôt qui en résulte. Que cette règle, en ce qui concerne mes voiles, n'ait qu'une valeur très conditionnelle, on le voit en jetant seulement un coup d'œil sur les planches qui accompagnent mon mémoire. Le désaccord qui se manifeste sur ce point entre les résultats de M. Pasteur et les miens, s'explique peut-être en partie par la circonstance que les expériences de M. Pasteur ont été faites à la température ordinaire d'un appartement, et qu'il a peut-être limité ses recherches microscopiques au premières phases du développement.

Selon M. Pasteur, les levûres aérobies des diverses espèces de levûres ont un aspect différent, d'après lequel on peut les distinguer l'une de l'autre. Comme il a été dit plus haut, tel n'était pas le cas pour les voiles que j'ai examinés. Même en n'opérant, comme M. Pasteur, qu'à la temperature ordinaire d'un appartement, la seule différence que j'ai observée sous ce rapport entre les six espèces se borne à ceci que, chez quelques-unes, le développement est plus marqué et plus raqide que chez les autres.

Si M. Pasteur, dans sa levûre aérobie, s'est trouvé en face du même phénomène que moi dans mes productions de voiles, il y a donc de grandes différences dans nos résultats. Nous nous plaçons en général à des points de vue différents dans nos études sur les ferments alcooliques; la raison en est en partie que M. Pasteur a surtout traité la question comme chimiste, moi, au contraire, comme botaniste.

En supposant que la levûre aérobie de M. Pasteur soit la même chose que mes voiles, le nom de levûre aérobie n'est pas bien choisi. Il en donne en effet lui-même, p. 115 de son ouvrage, cette définition qu'il doit désigner des organismes qui ne peuvent vivre sans air; mais nous savons que les cellules de mes voiles, lorsqu'elles sont submergées dans des liquides fermentescibles, peuvent les faire entrer en fermentation en dehors de l'influence de l'oxygène libre. Il est bien vrai qu'un abondant afflux d'air favorise le développement des voiles, mais on peut en dire autant du bourgeonnement et de la formation des ascospores (voir le texte danois, p. 204—205). Le plus essentiel d'ailleurs pour la formation des voiles est une surface libre et tranquille et non l'afflux de l'air. Si, par ex., on fait continuellement passer de l'air avec une force suffisante à travers des liquides nourriciers infectés de levûre, il ne se formera pas de voile, et on arrivera au même résultat en secouant de temps en temps le liquide.

L'autre nom de levûre-moisissure n'est également guère bien choisi. D'abord il est toujours fort douteux que les Saccharomyces, dont, pour ce qui me concerne, il est constamment question, soient des formes de développement de moisissures. Il en est en effet des recherches sur ce point comme de celles sur la génération spontanée, que tous les arguments produits jusqu'ici à l'appui de cette interprétation n'ont pu soutenir une épreuve exacte. Ensuite c'est une question encore ouverte, si les cellules de levûre, lorsqu'elles vivent dans des végétations de voiles à la surface du liquide, opèrent les mêmes transformations chimiques que les véritables végétations de moisissures; les recherches que j'ai commencées à ce sujet ne sont pas encore assez avancées pour que je puisse, en ce moment, me prononcer là dessus. Entre autres motifs qui s'opposent à l'introduction de nouveaux noms pour notre phénomène, on

peut aussi relever celui-ci, qui a déjà été mis en avant dans l'introduction au présent mémoire, à savoir que la formation des voiles chez les Saccharomyces n'est pas une forme de développement qui leur soit propre, mais au contraire un phénomène général dans la monde des microorganismes.

Mais si la levûre aérobie de M. Pasteur est un tout autre phénomène que celui qui est traité dans le présent mémoire, et si ce nom désigne des espèces particulières de levûres, comme un des disciples du maître l'a du moins compris, l'examen qui précède de la valeur des noms est naturellement superflu.

La raison pour laquelle nous ne pouvons pas décider avec certitude par l'ouvrage de M. Pasteur de quoi il est au fond question, c'est surtout, comme il le dit lui-même clairement dans la note citée, p. 205, qu'il n'était pas possible de déterminer s'il y avait dans chaque ballon une ou plusieurs espèces. Un autre motif d'incertitude est que, ni dans le chapitre de la levûre aérobie, ni en somme ailleurs, on ne voit s'il est question de Saccharomyces ou seulement de cellules ressemblant à des Saccharomyces. Les mots Saccharomyces et levûres désignent en effet, chez M. Pasteur, des ferments alcooliques en général, avec une faculté fermentative bien prononcée et des cellules de levûres bourgeonnantes, par conséquent des organismes qui peuvent appartenir à des divisions très différentes dans notre système actuel. D'après sa manière de voir (p. 164, 165, 177), ce sont des formes de développement de certaines moisissures encore peu connues ressemblant à des Dematium. Sur la question de l'espèce, qui est en étroite connexion avec ce qui précède, M. Pasteur n'a émis aucune opinion arrêtée. Dans quelques endroits, par ex. p. 147, il semble croire que les organismes dont il s'agit ont des caractères spécifiques constants; dans d'autres, par ex. p. 193, le lecteur attentif reçoit l'impression qu'ils ont une faculté illimitée de variation et qu'il n'y a pas d'espèces parmi eux. Ces deux opinions contraires sont exprimées dans le chapitre sur la levûre aérobie, que nous avons surtout examiné.

Mais pour comprendre ce célèbre ouvrage comme il doit l'être, nous devons toujours retenir que son but, dans ce domaine, était seulement de donner une série de recherches provisoires. Exécuter jusqu'au bout ces recherches n'était guère possible au point où se trouvait alors la sciencc, et depuis lors, chacun le sait, l'illustre savant a consacré ses forces à de tout autres problèmes, des problèmes dont la solution a ouvert un monde nouveau à la médecine et à la biologie.

RÉCAPITULATION.

Dans la première partie de ce mémoire, j'ai fait voir que la formation des voiles est un phénomène très commun dans le monde des microorganismes, et qu'elle a lieu aussi bien chez les bactéries que chez les champignons proprement dits et chez des formes appartenant aux différentes divisions dans le système (p. 106—109).

Nous avons aussi observé cette formation chez les Saccharomyces. et en particulier appris que les végétations, dans les voiles des vieilles cultures, développent. dans les conditions indiquées, des cellules plus allongées et, en général, des colonies plus complexes que les végétations de la semence correspondante; le Sacch. cerevisiæ et le Sacch. ellipsoïdeus du système étaient par là transformés en Sacch. Pastorianus; il s'est produit aussi un développement de cellules filiformes et ressemblant à des bactéries (p. 109—112 et Fig. 3, Pl. III—VIII), Ces observations ont servi de point de départ à des expériences méthodiques avec les six espèces mentionnées dans mes mémoires antérieurs,

Nous avons trouvé qu'une des conditions pour qu'il se produise sous ce rapport un développement bien marqué, c'est que la levûre sur laquelle on opère ait largement accès à l'air atmosphérique. Les expériences ont en conséquence été faites dans des flacons à demi remplis, coiffés de papier à filtrer stérilisé, et on a en outre employé un liquide nourricier favorable, à savoir du moût de bière (p. 112).

En examinant au microscope les cellules de l'ensemencement de cultures pures homogènes, nous avons trouvé qu'elles pouvaient être rapportées à trois divisions, dont l'une comprend le Sacch. cerevisiæ I, la deuxième, les trois espèces du groupe Sacch, Pastorianus, et la troisième, les deux espèces du groupe Sacch. ellipsoïdeus (p. 112—113 et Pl. I—II).

Les tableaux, p. 114—115, nous donnent un aperçu du développement des voiles á différentes températures. Nous avons surtout appris par là que les premières phases de ce développement, à 13—15 ^{0} C., représentées Fig. 2, Pl. IV—VIII et Fig. 1, Pl. III, présentent des différences bien marquées entre plusieurs de nos six espèces. Il est particulièrement important pour nous que le Sacch. Pastorianus II et le Sacch, Pastorianus III, les deux espèces qui sont des levûres hautes, et dont les cellules de l'ensemencement ne peuvent avec certitude être distinguées les unes des autres, apparaissent ici avec des végétations complètement différentes; il en est de même du Sacch. ellipsoïdeus I et du Sacch. ellipsoïdeus II, deux espèces dont les semences sont similaires, Il est en outre intéressant de voir comment le Sacch. ellipsoïdeus I si caractérisé dans la semence par ses cellules ovales, a formé ici des colonies ressemblant à du mycelium, et est devenu un des Sacch. Pastorianus du système, tandis que le Sacch. Pastorianus II s'est comporté d'une manière inverse. Nous avons vu également que le développement est plus ou moins rapide et marqué chez les différentes espèces, et que leurs températures limites sous ce rapport sont aussi différentes (p. 114—119).

Nous avons constaté que le bourgeonnement et la fermentation ont lieu au-dessus d'une température à laquelle, dans les mêmes circonstances, aucun voile ne peut se développer. et que les espèces qui ont les températures maxima les plus élevées pour le bourgeonnement et la fermentation, les ont aussi pour la formation des voiles (p. 119).

En examinant la levûre de dépòt de nos cultures, nous avons vu que, dans quelques cas, elle était pâteuse, dans d'autres au contraire, membraneuse et plissée ou caséeuse, et que la même espèce, par un certain traitement, peut être amenée à produire chacune de ces levûres de dépòt, Ces cellules ont aussi présenté des différences de forme non sans valeur au point de vue systématique, et nous avons de nouveau appris que la même espèce, sous diverses influences extérieures, peut se comporter tout différemment et avoir un cachet tout différent; mais nous avons en même temps reconnu qu'il y a des limites à cette influence, et que nos six espèces réagissent d'une manière différente (p. 119).

Un des résultats pratiques de mes recherches est en particulier celui-ci, qu'elles m'ont conduit à une méthode pour l'analyse de la levûre des brasseries. Celles plus récentes qui sont exposées plus haut y ont aussi contribué. Ces travaux, comme tous ceux que j'ai éxecutés pour l'industrie, demeurent ou tombent avec la supposition que les Saccharomyces se comportent comme des espèces, des variétés ou des races, ou, en d'autres termes, que les caractères établis par moi sont constants. C'est aussi contre ce point que mes honorés adversaires, à Berlin, ont dirigé leur principale attaque (p. 120).

Tandis que la première partie du second chapitre traite surtout de la question principale qui domine toutes mes études sur les microorganismes, à savoir celle des espèces et de leur délimitation, la fin, au contraire, contient une série de renseignements divers sur d'autres points: sur la décoloration que les voiles déterminent dans le moût de bière (p. 124), sur l'influence que la composition chimique du liquide nourricier exerce sur le développement des voiles et la forme de leurs cellules (p. 125), sur la formation des spores endogènes (p. 125) et des noyaux dans les cellules des voiles (p. 125) et sur les formations mucilagineuses découvertes par moi, il y a deux ans, chez les cellules de levûre (p. 126).

Les contributions de mes prédécesseurs à la connaissance des voiles chez les Saccharomyces sont exposées p. 128—132. Nous avons trouvé chez M. Reess les premières indications de végétations de ce genre. M. Pasteur nous fournit des contributions plus étendues dans son célèbre ouvrage »Études sur la bière«. Au premier coup d'œil, il semble en effet que la levûre aérobie ou la levûre moisissure de M. Pasteur doive être la même chose que mes voiles; mais une étude plus approfondie nous montre un grand désaccord, et la question devient douteuse. Tandis que M. Pasteur, dans quelques endroits, semble croire que sa nouvelle levûre est une forme de développement de la levûre ordinaire de dépòt, il admet ailleurs la possibilité que les formes de la levûre aérobie se soient trouvées à l'état de mélanges cachés dans la levûre dont il s'est servi pour ses expériences; dans ce cas, ce sont donc des espèces particulières de levûres, et M. Pasteur s'est alors trouvé en face d'un autre

phénomène que celui dont je me suis occupé. L'étude détaillée á laquelle j'ai soumis le chapitre de la levûre aérobie dans l'ouvrage de l'illustre savant a d'ailleurs de nouveau montré que, dans nos recherches sur les levûres alcooliques, nous nous sommes placés à des points de vue différents.

EXPLICATION DES PLANCHES.

Toutes les figures ont un grossissement linéaire de 1000 fois. Les Pl. I et II représentent de jeunes et vigoureuses végétations dans de la levûre de dépôt ordinaire provenant de cultures dans du moût de bière (p. 112—113). Sur les Pl. III—VIII, sont représentées les végétations de voiles qui s'en sont développées à différentes températures et dans des temps différents (p. 109—118).

Planche I.

Fig, 1. Saccharomyces cerevisiæ I, p. 113.
- 2. Saccharomyces Pastorianus I, p. 113.
- 3. Saccharomyces Pastorianus II, p. 113.

Planche II.

Fig. 1. Saccharomyces Pastorianus III, p. 113.
- 2. Saccharomyces ellipsoïdeus I. p. 113.
- 3. Saccharomyces ellipsoïdeus II, p. 113.

Planche III.

Saccharomyces cerevisiæ I. p. 109, 114, 116.
Fig. 1. Végétations de voiles à 15—6 ° C.
- 2. Végétations de voiles à 34—20 ° C.
- 3. Végétations de voiles dans de vieilles cultures.

Planche IV.

Saccharomyces Pastorianus I, p. 110, 114, 116.
Fig. 1. Végétations de voiles à 28—20 ° C.
- 2. Végétations de voiles à 15—3 ° C.
- 3. Végétations de voiles dans de vieilles cultures.

Quelques-unes des cellules allongées dans la Fig. 1 ne sont pas bien dessinées.

Planche V.

Saccharomyces Pastorianus II, p. 110, 114, 116,
Fig. 1. Végétations de voiles à 28—20 ° C.
- 2. Végétations de voiles à 15—3 ° C.
- 3. Végétations de voiles dans de vieilles cultures.

Planche VI.

Saccharomyces Pastorianus III, p. 110, 115, 116

Fig. 1. Végétations de voiles à 28—20 ° C.
- 2. Végétations de voiles à 15—3 ° C.
- 3. Végétations de voiles dans de vieilles cultures.

Planche VII.

Saccharomyces ellipsoïdeus I, p. 110, 115, 116,

Fig. 1. Végétations de voiles à 34—20et à 6—7 ° C.
- 2. Végétations de voiles à 15—13 ° C.
- 3. Végétations de voiles dans de vieilles cultures.

Planche VIII.

Saccharomyces ellipsoïdeus II, p. 110, 115. 116.

Fig. 1. Végétations de voiles à 38—20 ° C.
- 2. Végétations de voiles à 28—3 ° C.
- 3. Végétations de voiles dans de vieilles cultures.

JUSQUÀ QUELLE LIMITE PEUT-ON, PAR LA MÉTHODE DE M. HANSEN, CONSTATER UNE INFECTION DE »LEVÛRE SAUVAGE« DANS UNE MASSE DE LEVÛRE BASSE DE SACCHAROMYCES CEREVISIÆ?

(DEUXIÈME COMMUNICATION).

PAR

JUST CHR. HOLM ET S. V. POULSEN.

Après n'avoir traité cette question, dans notre première communication, que pour une seule espèce de culture, à savoir celle de la levûre basse n° **1** de Carlsberg, dont on se sert dans la brasserie de Vieux Carlsberg et, en général, dans les brasseries scandinaves, il était naturel de soumettre d'autres espèces de cultures à la même épreuve, afin de pouvoir constater dans quelle étendue la température à laquelle on avait opéré se laissait employer.

Tel est l'objet de la première partie des nouvelles recherches que nous publions aujourd'hui.

Dans ses recherches sur les espèces de levûres employées à Vieux Carlsberg, M. le Dr Hansen avait trouvé que la levûre basse n° 2 de Carlsberg ne peut pas, comme la levûre basse n° 1 de Carlsberg, être analysée à 25° C., mais à une température de 15—16° C. Ce résultat, M. Hansen l'a entre autres exposé dans les cours qu'il a faits dans les dernières années au laboratoire pour des naturalistes étrangers, et il a ainsi passé dans la littérature comme on la trouve mentionné, par exemple, dans »Die Mikroorganismen der Gährungsindustrie« de M. Jørgensen. Ce même résultat nous a fourni le second point de départ de nos recherches. Dans le cours de ce travail ont en outre surgi d'autres questions de moindre importance dont nous rendrons également compte dans cette communication.

Pour nos nouvelles recherches nous nous sommes servis en partie de la levûre basse n° 2 de Carlsberg; en partie d'un certain nombre (18) d'autres levûres basses choisies au hasard et cultivées à l'état de pureté, mais qui toutes avaient été essayées dans des brasseries, tant en Da-

nemark qu'à l'étranger, et trouvées bonnes. Nous étions ainsi assurés non seulement de toujours opérer avec des levûres de culture essayées dans des brasseries, mais en même temps de comprendre dans notre étude un grand nombre d'espèces, notre but étant justement de trouver, si possible, des cas où la méthode ne fût pas applicable.

A cette occasion, nous ferons remarquer que, tandis que par la levûre basse n° 1 de Carlsberg (ne pas confondre avec le Sacch. cerevisiæ I de M. Hansen), on désigne partout, tant à Vieux Carlsberg que dans d'autres brasseries, une seule espèce bien déterminée, a savoir celle avec laquelle M. Hansen, à la fin de 1883, a introduit des cultures pures dans l'exploitation de la brasserie, la levûre basse n° 2 de Carlsberg ne désigne pas une, mais plusieurs espèces différentes qui ont été successivement essayées dans cette brasserie.

Parmi les autres espèces de levûres sur lesquelles ont porté nos expériences, nous mentionnerons spécialement les suivantes.

La levûre de la Hofbräuhaus et celle de l'Augustinerbräuhaus, qui ont été préparées par M. le Dr Will dans la »Wissenschaftliche Station für Brauerei«, à Münich, et qui, dans les grandes brasseries de l'Europe centrale, jouent un aussi grand rôle que la levûre basse n° 1 de Carlsberg dans les brasseries scandinaves, et la levûre de M. le Dr Elion, qui est d'un usage général dans les brasseries de Heineken à Amsterdam et à Rotterdam. Une grande partie des autres levûres sont dues à M. Jørgensen. M. Will a donné des renseignements sur les levûres de la Hofbräuhaus et de l'Augustinerbräuhaus dans »Zeitschr. für das ges. Brauwesen« 1887, Nr. 16. MM. E. Borgmann (Zeitschr. f. analyt. Chemie XXV, Liv. IV p. 532) et K. Amthor (Zeitschr. f. physiol. Chemie XII, p. 64) ont fait sur plusieurs des espèces traitées dans notre mémoire, das recherces chimiques et physiologiques, qui ont entre autres montré que les espèces présentent aussi sous ce rapport des différences considérables.

De même que dans notre première communication, nous nous sommes servis pour nos mélanges de 3 espèces Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III et Sacch. ellipsoïdeus II, qui, ainsi que l'ont montré les recherches de M. Hansen, occasionnent des maladies dans la bière, et sont en même temps, que l'on sache, les seules chez qui ce fait a été constaté.

Il importe de rappeler que la préparation de la levûre — tant des espèces de culture que des espèces de maladie — a été faite exactement d'après la méthode décrite par M. Hansen dans le travail qui sert de base à toutes ces analyses: »Les ascospores chez le genre Saccharomyces« (II Vol. 2 Liv. 1883, p. 30).

Pour ce qui concerne la première partie de nos recherches, à savoir si, parmi les espèces par nous examinées, il y en avait qu'on pût analyser à 25 ° C. comme la levûre basse n° 1 de Carlsberg, nous en avons, sur 19, trouvé 5 qui, au bout de 40 heures, se laissaient analyser à cette température. Ces 5 formes différaient entre elles par le temps que demandait la formation des ascospores, ce qui prouvait bien qu'elles étaient des espèces différentes; l'une, par exemple, formait ses ascospores au bout de 3 jours, tandis que les autres ne les développaient qu'après 5 jours (à 25—26,5 C °). Il est à remarquer que la levûre

basse n° 1 de Carlsberg, qui constitue le type de ces espèces par rapport au temps où les ascospores se développent, ne donne pas encore d'ascospores au bout de 4 jours, de même qu'elle ne les développe en général qu'à un très faible degré, ce qui a déjà été exposé d'abord par M. Hansen et plus tard par MM. Jørgensen et Will, comme aussi mentionné par nous dans notre première communication.

Ce premier point a donc donné pour résultat que, sur les 19 espèces examinées, il s'en est trouvé 5 qui ont pu être analysées à 25 ° C. comme la levûre basse n° 1 de Carlsberg.

Nous arrivons maintenant au second point sur lequel ont surtout porté nos recherches: est-ce que les autres espèces qui ne se laissent pas analyser à 25 ° C. peuvent l'être à la température de 15—16 ° C. trouvée pour la levûre basse n° 2 de Carlsberg, ou faut-il essayer d'autres températures?

Avant de nous occuper de cette recherche, nous devons exposer comment les trois levûres de maladie de M. Hansen se comportent dans ce cas. Relativement au Sacch. Pastorianus I, la formation des ascospores à 15 ° C. se montre après 50 heures (suivant le mémoire cité plus haut de M. Hansen). Nous avons trouvé que, à 15,5 ° C., sa présence peut facilement être constatée après 72 heures pour une proportion de 1 %, tandis que ½ % peut bien l'être dans les mêmes circonstances, mais avec quelque difficulté. Le Sacch. Pastorianus III forme des ascospores à 16 ° C. après 53 heures (suivant M. Hansen); de même que pour le précédent, nous en avons facilement, à 15,5 ° C., constaté un mélange de 1 % après 72 heures, mais plus difficilement ½ %. Il en est de même aussi du Sacch. ellipsoïdeus II, pour lequel le mémoire précité ne donne aucune indication à 15—16 °, mais qui, d'après nos recherches, développe des ascospores à 13,75—15 ° C., à peine après 3 jours. On peut donc, après 72 heures, constater facilement un mélange de 1 % de toutes ces formes, et c'est même possible, quoique plus difficile, pour un mélange de ½ %.

En tant, par conséquent, que les espèces par nous examinées, qui ne se laissent pas analyser à 25 ° C., se comportent comme la levûre basse n° 2 de Carlsberg, on pourra, pour leur analyse, employer une température de 15—16 ° C. En opérant ainsi, nous avons trouvé que la moitié de ces espèces (7 sur 14) ne produisait des ascospores qu'après 4 jours (parmi elles figure la levûre basse n° 2 de Carlsberg), c'était le plus ordinaire; quant aux autres, ces formations, chez quelques-unes, n'ont apparu qu'après 5—6 jours, mais il y en avait aussi quelques-unes (4) chez lesquelles les ascospores n'ont pas mis 4 jours à se produire. A ces dernières appartiennent, entre autres, les levûres de la Hofbräuhaus, de l'Augustinerbräuhaus et du Dr Elion. Celle dont les ascospores se développent le plus tôt à cette température est la levûre de l'Augustinerbräuhaus, qui, à 15 ° C., donne des ascospores après 82 et, à 16 ° C., après 73 heures; puis vient la levûre de la Hofbräuhaus, qui, à 15 ° C. donne des ascospores après 90 et, à 16 ° C., après 72 heures, tandis que la levûre de M. Elion, aux mêmes températures, n'en donne qu'après 95—97 heures. On voit donc qu'une température de 15—16 ° C. convient bien dans la plupart de cas, mais pas dans tous,

tandis qu'une température de 15^0 C., avec un intervalle de 72 heures pour la formation des ascospores, peut être employée pour nos 14 formes.

Cette partie de nos recherches nous a ainsi conduits à ce résultat, que 14 de nos espèces, par conséquent le plus grand nombre, se rattachent surtout à la levûre basse n° 2 de Carlsberg, en ce qui concerne l'analyse, qu'elles peuvent par suite être essayées à 15^0 C., puisque les levûres sauvages, à cette température, produisent leurs ascospores après 72 heures, et les levûres de culture au plus tôt après 82—90 heures et, en général, beaucoup plus tard.

Mais nous ne nous sommes pas bornés à déterminer le temps que demande la formation des ascospores aux températures de 25 et de 15^0 C. Nous avons aussi opéré à d'autres températures comprises entre 35 et 10^0 C., et constaté que les diverses espèces industrielles présentent également, sous ce rapport, de grandes différences, notamment en ce qui concerne les températures maxima et minima. Il y avait ainsi des formes qui, à 11—12^0 C., développaient des ascospores après 6 jours, d'autres seulement après 9—10 jours — et c'était l'ordinaire — tandis que d'autres n'en produisaient qu'après 12—14 et même 17 jours, et que certaines n'en présentaient pas trace après 20—24 jours. De même, il se produisait, après 2—3 jours, des ascospores chez quelques formes à la température de 30—32^0 C., tandis que d'autres, à la même température, n'en donnaient pas du tout.

On pourrait maintenant demander si, parmi ces températures, il n'y en avait pas quelques-unes qu'on pût employer pour l'analyse, et nous considérons d'abord la température de c. 30^0 C. Pour une des levûres de maladie, le Sacch. ellipsoïdeus II, une analyse à cette température serait d'une grande importance; cette forme est en effet la plus mauvaise, en ce qui concerne la maladie du trouble de la levûre (voir le mémoire de M. Hansen: »Maladies provoquées dans la bière par des ferments alcooliques« 2 Vol. 2 Liv. 1883, p. 52). Nous savons, d'après le mémoire cité plus haut de M. Hansen, qu'à 29—$31{,}5^0$ C., elle développe des ascospores après 22—23 heures, et, d'après nos recherches, on peut, à la température de 30^0 C. en constater après 43 heures un mélange de seulement 1 $^0/_0$ et $^1/_2$ $^0/_0$.

Il sera donc possible de constater une infection de ce genre chez les formes qui, à cette température, ne développent des ascospores qu'après 3 jours, ou encore plus tard ou pas du tout. Des 14 formes qui peuvent être analysées à 15^0 C., nous en avons trouvé 9 qui peuvent aussi l'être à 30^0 C.; quant aux 5 qui se laissent analyser à 25^0 C., nous savons avec certitude que l'une d'elles est analysable à 38^0 C., et nous devons supposer qu'il en est de même des autres. Enfin la levûre basse n° 1 de Carlsberg peut aussi être rangée dans cette classe, de sorte que, sur 20 formes, il y en a 15 qui, lorsqu'il s'agit d'une infection par le Sacch. ellipsoïdeus II, se laissent, après 43 heures, analyser à 30^0 C. pour cette levûre de maladie, même si elle n'entre dans le mélange que dans la faible proportion de 1 $^0/_0$—$^1/_2$ $^0/_0$.

On pourrait enfin demander s'il ne serait pas possible d'entreprendre l'analyse de levûres sauvages à une température plus basse que 15^0 C.,

et nous avons aussi essayé d'opérer à 12 ⁰ C. Le résultat a été que, parmi les 20 espèces examinées, nous en avons trouvé 14 qui se laissent analyser à cette température. Mais les analyses prennent alors plus de temps, et ne peuvent pas être faites avec la même précision qu'à 25 et à 15⁰ C.

Relativement aux analyses exécutées à 15 et à 12⁰ C., nous ferons observer que les températures sont un peu plus difficiles à obtenir qu'à 25⁰ C., comme elles sont si voisines de celle qui règne en général dans le laboratoire; il faut alors placer les thermostats dans un endroit plus frais, par exemple dans une cave, s'ils ne peuvent être mis en communication avec une glacière.

Pour nos cultures d'ascospores, nous nous sommes servis de capsules qui, au lieu d'être, comme auparavant, recouvertes d'une plaque de verre, étaient munies d'un couvercle ne fermant pas bien. Il importe dans ces cultures faites sur le plâtre pour provoquer la formation des ascospores que la levûre communique aussi librement que possible avec l'air; emploie-t-on des capsules de verre avec un couvercle fermant bien — et on l'a essayé au laboratoire en se servant de capsules qui, jusqu'à un certain degré, étaient transformées en ballons Pasteur à deux cols, de manière à éliminer toute infection du dehors — il peut très bien arriver que la formation des ascospores soit complètement arrêtée, ou, en tout cas, qu'il n'y ait qu'un très petit nombre de cellules qui en produisent. Couvre-t-on au contraire la capsule avec une plaque de verre qui ne ferme pas bien (le bord de la capsule ne doit pas être poli), l'air afflue librement, mais il se produit aussi un développement assez grand de bactéries, surtout à des températures un peu élevées, ce qui cependant ne semble pas avoir une influence bien marquée sur le nombre plus ou moins grand des cellules qui produisent des ascospores. Mais pour que cette plaque de verre reste en place, il faut la fixer à la capsule avec de la cire à cacheter, et on est alors forcé, chaque fois qu'on veut prendre des échantillons et que la plaque doit être enlevée, de sortir les cultures du thermostat afin de fixer de nouveau la plaque à la capsule avec de la cire, opération pendant laquelle elles sont exposées à un refroidissement ou à un échauffement qui peut avoir de l'influence sur la formation des ascospores. C'est pour ce motif qu'on emploie des capsules avec un couvercle ne fermant pas bien. (Voir la figure).



La stérilisation peut se faire soit à l'aide d'une lampe à gaz de Bunsen, avec laquelle on flambe la capsule, le couvercle et le bloc de plâtre, soit par un séjour d'une heure dans une étuve chauffée à 115⁰ C., après que le bloc de plâtre a été placé dans la capsule, le couvercle mis dessus et le tout enveloppé dans deux couches de papier à filtrer. Il est indispensable de veiller avec soin à ce que la température de l'étuve ne s'élève pas trop haut, de manière à faire perdre au plâtre trop de son eau de cristallisation, car, dans ce cas, les blocs tombent en poussière lorsqu'on y verse la grande quantité d'eau que ces

essais nécessitent. Il faut donc connaître exactement la température de l'étuve, laquelle, surtout près du fond, est souvent notablement plus élevée que celle indiquée par le thermomètre qui, à travers le plafond de l'étuve, plonge dans son intérieur. La température de 115 ⁰ C. est le degré de chaleur auquel les blocs doivent être exposés. Si la température au fond de l'étuve est beaucoup plus élevée, on peut remédier à cet inconvénient en intercalant 1 à 2 doubles fonds d'asbeste percés de trous et séparés l'un de l'autre par de petits tasseaux de bois.

Relativement à la préparation des blocs de plâtre, nous ferons remarquer que, si c'est un plâtrier qui les fabrique, il faut lui rappeler que la forme qui sert à les mouler ne doit pas être enduite d'huile ni de matière grasse. Nous avons en effet constaté que la surface graissée qu'ont alors les blocs entrave la formation des ascospores. On peut du reste très facilement fabriquer soi-même ces blocs de plâtre, en mélangeant dans une forme en ferblanc 2 volumes de plâtre en poudre avec $^3/_4$ de volume d'eau.

Pour ce qui regarde le degré de sécheresse ou d'humidité des blocs lorsqu'on y sème la levûre, les expériences faites au laboratoire ont fait voir que ce point n'a aucune importance. On a ainsi fait des ensemencements de Sacch. éllipsoïdeus II, en partie sur des blocs secs très avides d'eau, en partie sur des blocs préalablement rendus humides, et le résultat a été le même dans les deux cas. D'autres essais ont aussi montré que la nature du bloc, sous ce rapport, ne produit aucune différence; cependant on ne doit pas naturellement projeter de l'eau sur la levûre.

Il résulte donc de nos expériences que les 20 espèces de levûre de bière examinées jusqu'ici au point de vue de leur analyse, d'après la méthode de M. Hansen, se divisent en 2 groupes principaux, dont l'un se laisse le mieux analyser à 25 ⁰ C. après 40 heures, et l'autre à 15 ⁰ C. après 72 heures; et que, dans les deux cas, on est en état de constater un mélange aussi faible que 1 % et $^1/_2$ % de levûre sauvage. Relativement aux espèces du premier groupe, quelques-unes entre elles, mais pas toutes, peuvent être aussi analysées à 15 ⁰ C,

Comme on se rappelle, la méthode a seulement été essayée par rapport à trois formes de maladie: le Sacch. Pastorianus I, le Sacch. Pastoriauus III et le Sacch. ellipsoïdeus II; mais en examinant les courbes construites par M. Hansen pour montrer le développement des endospores chez les deux autres espèces de levûres sauvages étudiées par lui, le Sacch. Pastorianus II et le Sacch. ellipsoïdeus I, nous trouvons que ces espèces rentrent également dans la règle exposée ci-dessus.

La méthode est donc aussi, sans ce rapport, susceptible d'une large application.

RECHERCHES SUR LA PHYSIOLOGIE ET LA MORPHOLOGIE DES FERMENTS ALCOOLIQUES.

PAR

EMIL CHR. HANSEN.

VII.

ACTION DES FERMENTS ALCOOLIQUES SUR LES DIVERSES ESPÈCES DE SUCRE.

(PREMIER MÉMOIRE).

1. Introduction.

Les expériences décrites plus loin ont été faites avec quatre espèces de sucre, la Saccharose, la Maltose, la Lactose, et la Dextrose, et avec environ 40 levûres, à savoir: les six Saccharomyces que j'ai, en 1883, introduits dans la littérature, le Sacch. Marxianus, le Sacch. exiguus, le Sacch. membranæfaciens, 10 espèces de levûres basses des brasseries (Sacch. cerevisiæ), le Mycoderma cerevisiæ, le Sacch. apiculatus, 7 espèces du Torula genre de M. Pasteur, le Monilia candida, le Mucor erectus, le Mucor spinosus, le Mucor Mucedo, le Mucor racemosus avec quelques espèces imparfaitement décrites de ce dernier genre et l'Oidium lactis. C'est ainsi l'étude la plus vaste qui ait été exécuté jusqu'ici dans ce domaine. Je suis cependant convaincu qu'il existe encore dans la nature des combinaisons physiologiques plus nombreuses que celles que j'ai observées, mais en même temps j'ai lieu de croire que mes recherches ont été assez étendues pour nous donner en somme une idée claire de la variété qui règne dans ce monde des microorganismes.

Ce que nous avons jusqu'ici su à ce sujet se réduit à peu de chose, et on ignorait surtout quelle est, dans la plupart de cas, l'action des levûres alcooliques sur la maltose. Mais, au point de vue de l'industrie de la fermentation, cette espèce de sucre présente précisément un intérèt spécial, de même qu'il s'y rattache aussi plu-

sieurs problèmes théoriques. Pour des raisons pratiques, nous n'avons pas compris les bactéries dans ces recherches, bien qu'il y en ait aussi quelques-unes qui peuvent provoquer la fermentation alcoolique.

Les sucres sur lesquels j'ai opéré étaient dissous dans l'eau, soit sans addition aucune — et tel était toujours le cas, sauf indication contraire — soit avec une addition de la décoction d'eau de levûre souvent employée par M. Pasteur et d'autres auteurs. Le moût était du moût houblonné ordinaire (14—15 $^0/_0$ Ball.), tel qu'on l'emploie dans les brasseries à fermentation basse pour la bière de garde. Tous les liquides étaient naturellement stérilisés, et on a toujours opéré avec des cultures absolument pures. Ces cultures, en ce qui concerne les cellules de levûre, étaient préparées d'après la méthode décrite dans mes mémoires précédents. Pour les Mucors, j'ai pris pour point de départ un seul sporange, par conséquent aussi l'individu. Que ce soit là la seule voie sûre, c'est ce que j'ai eu largement l'occasion d'apprendre après une expérience de plusieurs années.

Les figures sont dessinées en partie par mon aide M. Holm, en partie par moi-même. Le grossissement linéaire est partout de 1000 fois.

D'après sa nature, ce travail doit comprendre un grand nombre d'analyses similaires et être très riche en détails, car c'est seulement par cette voie qu'on peut établir une comparaison et arriver à se faire une vue d'ensemble. Dans chaque partie, j'ai d'abord communiqué les analyses sur lesquelles tout repose, et exposé ensuite les résultats généraux qu'on peut en déduire. J'ai enfin, dans le dernier chapitre, jeté un coup d'œil rétrospectif sur le tout.

2. Saccharomyces.

Les six espèces avec lesquelles j'ai surtout expérimenté dans les dernières années, à savoir: le Sacch. cerevisiæ I, le Sacch. Pastorianus I, le Sacch. Pastorianus II, le Sacch. Pastorianus III, le Sacch. ellipsoïdeus I et le Sacch. ellipsoïdeus II, développent tous de l'invertine; elles transforment par là la saccharose en sucre inverti et la font fermenter. Il est à peine besoin d'ajouter qu'elles font aussi fermenter la dextrose. Elles provoquent également une active fermentation dans les dissolutions de maltose, surtout lorsqu'on y ajoute un peu de liquide nourricier, par exemple, la décoction d'eau de levûre. Ce sont tous des ferments actifs qui, dans le moût de bière, à la température ordinaire d'un appartement, donnent facilement, au bout de 14 jours, 4—6 volumes $^0/_0$ d'alcool. Par contre, elles ne peuvent pas plus que les nombreuses levûres essayées jusqu'ici provoquer la fermentation dans les dissolutions de lactose. D'autres auteurs, par exemple MM. Pasteur, Fitz et Duclaux [1]), sont arrivés au même résultat.

---

[1]) Dernièrement cependant M. Duclaux a publié dans les Annales de l'institut Pasteur, 1887, n° 12, qu'il a découvert dans le lait une levûre qui

Ce qui précède s'applique également à toutes les formes de levûres basses employées dans l'industrie, qui ont été étudiées.

Mais le Sacch. Marxianus, le Sacch. exiguus et le Sacch. membranæfaciens se comportent tout autrement.

Sacch. Marxianus nov. spec.

Sous ce nom, je désigne une espèce qui, lorsqu'on la cultive dans du moût de bière suivant la méthode que j'ai indiquée dans mes mémoires précédents, développe de petites cellules ovales et oviformes qui ont le même aspect que le Sacch. exiguus et le Sacch. ellipsoïdeus. Mais, entre ces cellules, il s'en produit rapidement d'autres, allongées en forme de boudin, souvent réunies en colonies, et laisse-t-on la culture reposer pendant quelque temps, il se forme de petits corps ressemblant à des moisissures, qui en partie nagent dans le liquide, en partie se précipitent. Ils se composent de colonies enchevètrées ayant l'apparence d'un mycelium, et essentiellement de même nature que les voiles que j'ai décrits et représentés chez mes six espèces de Saccharomyces [1]), elles sont comme eux formées d'articles qui, à leurs points de jonction, sont étranglés et se séparent facilement. Nous avons donc ici une espèce que nous pourrions, après M. Reess, rapporter tout aussi bien au groupe Sacch. Pastorianus qu'au Sacch. exiguus ou au Sacch. ellipsoïdeus. Elle appartient aux Saccharomyces qui ne développent pas beaucoup d'endospores. Ces derniers se distinguent en ceci, qu'ils sont souvent plus au moins réniformes; cependant d'ordinaire on trouve en même temps des formes rondes et ovales. J'ai aussi observé des irrégularités analogues chez les spores d'autres Saccharomyces, mais elles sont particulièrement prononcées chez l'espèce dont il s'agit. Après 2—3 mois de repos, les cultures au moût dans les ballons à deux cols ne présentaient que des traces de voiles, avec un petit nombre de cellules, les unes courtes et en forme de boudin, les autres ovales. C'est une des espèces avec lesquelles j'ai réussi, dans certaines conditions de culture sur un substratum nourricier solide, à faire produire par la cellule de Saccharomyces un mycelium semblable à celui qui se produit si souvent chez plusieurs moisissures à conidies de levûre.

Dans le moût de bière, elle n'a donné, même après un long repos, que 1—1,3 vol. % d'alcool, et aussi n'a-t elle produit aucune fermentation dans la maltose. Elle invertit les dissolutions de saccharose, et dans l'une d'elles, composée de 15 % de saccharose dans de l'eau de levûre, elle a, après 18 jours, à 25 ° C., produit 3,75 vol. % d'alcool et, après 38 jours, 7 vol. %.

---

peut provoquer la fermentation alcoolique dans une dissolution de lactose. Si cette espèce produit ou non des endospores, c'est ce qu'il ne mentionne pas.

[1]) Emil Chr. Hansen: Les voiles chez le genre Saccharomyces (Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg, Vol. II, Liv. 4, 1886, Pl. III—VIII).

Dans deux dissolutions d'eau de levûre, dont l'une contenait 10 et l'autre 15 $^0/_0$ de dextrose, elle a donné, dans les mêmes circonstances, après 14 jours, dans le premier cas 5,1 et, dans le second, 5,6 vol. $^0/_0$ d'alcool. Après 1 mois de repos, on a trouvé dans le premier ballon 6,5 et, dans le second, 8 vol. $^0/_0$ d'alcool.

J'ai appelé cet intéressant Saccharomyces d'après le zymotechnologue distingué, M. Louis Marx, de Marseille, qui le premier l'a découvert sur des raisins.

Sacch. exiguus.

Ce nom, je l'ai attaché à un Saccharomyces qui, dans les conditions de culture mentionnées plus haut, développe une végétation qui cadre avec les formes de cellules auxquelles M. Reess a donné le même nom; voilà pourquoi je propose qu'il soit adopté pour l'espèce dont il est question ici. Je ne saurais naturellement décider si M. Reess l'a précisément eu en vue. De petites cellules de levûre comme celles qui ont reçu de lui et de ses successeurs le nom de Sacch. exiguus peuvent être développées par n'importe quelle espèce de Saccharomyces et, sous certaines conditions, en grande majorité.

Le Sacch. exiguus ne se prête certainement guère mieux que l'espèce précédente à développer des endospores. La formation des voiles est également très pénible; ses cultures dans le moût de bière n'en ont donné que des traces, même après plusieurs mois de repos dans des ballons Pasteur; par contre, il produit un anneau de levûre assez développé le long du bord du liquide. Les cellules des voiles ressemblent en général à celles de la levûre de fond, cependant les cellules courtes en forme de boudin et les petites formes y sont certainement plus nombreuses. Je l'ai, il y a quelques années, trouvé assez communément dans une levûre de boulangerie. Il se distingue du Sacch. Marxianus surtout en ceci, que, dans les cultures au moût, il ne produit pas de colonies ressemblant à un mycelium, et, sur un substratum nourricier solide, aucun mycelium.

Mais, dans son action sur les sucres, il ressemble à cette espèce, comme je l'ai déjà fait observer dans mon mémoire de 1886, cité plus haut. Cependant, dans les conditions où j'ai opéré, il a produit une fermentation plus active tant dans les dissolutions de saccharose que dans celles de dextrose.

Dans les cultures au moût il n'a donné, comme l'espèce précédente, que 1—1,3 vol. $^0/_0$ d'alcool et, après plusieurs mois de repos, cette proportion d'alcool n'a pas augmenté.

Il ne provoque aucune fermentation dans les dissolutions de maltose, mais invertit celles de saccharose et, dans des dissolutions renfermant 10 et 15 $^0/_0$ de sucre de canne dans de l'eau de levûre, il a produit après 14 jours de culture à 25^0 C. 5,6 vol. $^0/_0$ d'alcool. Après 26 jours de repos, on a trouvé dans le ballon, avec la dissolution concentrée de sucre, 6 vol. $^0/_0$ d'alcool.

Dans deux dissolutions de I0 et 15 $^0/_0$ de dextrose dans de l'eau de levûre, il a, dans les mêmes circonstances, donné après 14 jours

respectivement 6.4 et 8 vol. % d'alcool, et après un mois la quantité d'alcool, dans les deux cas, était encore la même.

Nous arrivons ensuite à une espèce nouvelle:

Sacch. membranæfaciens nov. spec.

Dans le moût de bière, cette espèce produit rapidement sur toute la surface du liquide un voile gris clair, plissé et fortement développé, qui se compose principalement de cellules en forme de boudin et de cellules allongées ovales, riches en vacuoles et ayant en général l'air d'être plus ou moins vides. Elles sont en partie réunies en colonies, en partie isolées, et il y a entre elles un abondant mélange d'air. Le Sacch. membranæfaciens se distingue entre autres par sa grande richesse en endospores, car ceux-ci ne se développent pas seulement en grand nombre dans les conditions de culture indiquées pour les espèces précédentes [1]), mais aussi d'ordinaire dans les voiles,

Les cellules bien réparties dans de la gélatine nourricière, composée de moût de bière avec 5—6 % de gélatine, forment des taches mates, grises et souvent avec une légère teinte rougeâtre, qui d'ordinaire étaient étalées, arrondies et ridées. Mais cette description ne s'applique qu'aux végétations qui s'étaient complètement fait jour; les taches encore recouvertes par la gélatine avaient en effet un tout autre aspect, et dans les cas où celle-ci était si mince qu'on ne pouvait l'observer qu'à grand peine, elles faisaient l'impression d'appartenir à une toute autre espèce, un nouvel exemple des erreurs auxquelles on peut être exposé dans ces recherches, Les taches complètement developpées se distinguent facilement de celles qui, dans des conditions analogues, sont produites par tous les autres Saccharomyces examinés jusqu'ici; par contre, elles ressemblent beaucoup aux taches que forment le Mycoderma vini et le Mycod. cerevisiæ [2]).

Il ne provoque de fermentation ni dans le moût de bière, ni dans aucune de nos quatre espèces de sucre, et n'invertit pas non plus la saccharose.

Ses végétations sur la gélatine nourricière se distinguent par la grande facilité relative avec laquelle elles la fluidifient.

Je l'ai trouvé dans une masse gélatineuse qui s'était développée sur des racines d'orme attaquées par divers champignons. Sous plusieurs rapports, il ressemble au Mycoderma vini et au Mycod. cerevisiæ, aussi, mais à tort, appelés Sacch. Mycoderma, qui sont si souvent mentionnés dans la littérature. Outre plusieurs petites différences, il s'en écarte cependant surtout par ce caractère, qu'il est un véritable Saccharomyces avec un développement très marqué d'endospores, lesquels font complètement défaut chez ces Mycodermes.

[1]) Emil Chr. Hansen: Les ascospores chez le genre Saccharomyces. (Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg, IIe vol. 2e liv. 1883, p. 30.)

[2]) Emil Chr. Hansen: Méthodes pour obtenir des cultures pures de Saccharomyces et de microorganismes analogues. (Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg, IIe vol. 4e liv. 1886, p. 101.)

Tandis que les espèces des Mycoderma ci-dessus nommés appartiennent aux champignons les plus communs, et ont par suite été l'objet de recherches sans nombre, le Sacch. membranæfaciens doit au contraire être considéré comme une espèce rare; en tout cas, malgré des recherches poursuivies pendant plusieurs années, je ne l'ai trouvé qu'une seule fois. Dans les circonstances où le Mycod. vini et le Mycod. cerevisiæ donnent rapidement une végétation spontanée, il n'apparaît pas.

Nous avons donc ici des cellules de levûre qui appartiennent bien à une espèce tout à fait typique de Saccharomyces, mais qui, au point de vue physiologique, ne peuvent cependant être rangées parmi les ferments alcooliques. M. Marpmann a cru trouver un organisme analogue dans le prétendu Sacch. niger, mais, après l'avoir examiné, j'ai trouvé qu'il ne produit pas d'endospores, et que ce n'est pas un Saccharomyces, mais un Cladosporium ou un Fumago.

Jusqu'à nouvel ordre, le Sacch. membranæfaciens est donc le seul Saccharomyces qui ne produise pas de fermentation alcoolique, et le seul qui n'ait pas d'invertine; tous les autres, comme on l'a vu, déterminent une active fermentation dans la saccharose et la dextrose, quelques-uns aussi dans les dissolutions de maltose, mais pas d'autres.

Résultats.

Notre première conception du genre Saccharomyces a été notablement modifiée par ces études; au point de vue physiologique, les espèces qui le composent ne peuvent plus dorénavant être caractérisées comme étant des ferments alcooliques, et, au point de vue morphologique, quelques-unes du moins peuvent développer un mycelium. Mes recherches ont aussi donné de nouveaux points de repère pour la connaissance des espèces, comme, par ex., les différences bien marquées qui, dans plusieurs cas, se manifestent dans l'action des cellules sur les sucres[1]).

---

[1]) Comme il a été dit dans l'introduction, l'objet principal du présent mémoire a été de déterminer si les espèces sur lesquelles j'ai expérimenté peuvent faire fermenter ou non les quatre espèces de sucre nommées plus haut, afin d'obtenir un aperçu des combinaisons qui résultent de ce point de vue. Les autres questions connexes, telles, par exemple, que le pouvoir fermentatif des espèces relativement à la production de l'alcool, devaient par suite être rejetées un peu plus à l'arrière-plan. Que cependant je sois arrivé par cette voie à observer aussi sous ce rapport des différences bien nettes, c'est ce qui ressort de la comparaison de mes expériences sur le Sacch. Marxianus et le Sacch. exiguus, et encore plus clairement des chapitres suivants. Mais si mon travail avait dû être complet dans ce domaine, il m'aurait fallu entreprendre des expériences comparatives avec toutes les espèces dans un seul et même

Tous les Saccharomyces observés, à l'exception d'une seule espèce (le Sacch. membranæfaciens) sont donc des ferments alcooliques types avec séparation d'invertine; ils font fermenter aussi bien la saccharose que la dextrose, celle-ci avec une énergie plus grande que celle-là, et la plupart, en même temps la maltose. Nous avons ainsi l'explication du rôle si considérable que ces organismes jouent dans l'industrie de la fermentation. En effet, d'après ce qui précède, la plupart peuvent être employés non seulement dans la fabrication des vins de raisins et d'autres fruits, mais aussi dans l'exploitation des brasseries et des distilleries. Que, dans l'industrie, on doive et on puisse faire un choix parmi eux, c'est ce que les recherches précédentes nous apprennent de nouveau.

Je traiterai plus tard en détail des espèces nouvelles dans un mémoire sur la systématique du genre Saccharomyces, et compte aussi y joindre les dessins nécessaires.

3. Levûres alcooliques à cellules ressemblant à des Saccharomyces.

Outre le Mycoderma vini, le Mycod. cerevisiæ et le Sacch, apiculatus, je range dans cette catégorie des cellules de levûre dont les espèces à faible pouvoir fermentatif semblent surtout se rapprocher de celles qui, dans les »Études sur la bière« de M. Pasteur, sont appelées Torula — nom dont je me suis servi afin d'avoir pour elles une désignation provisoire — et enfin une espèce qui se rattache à ces dernières, le Monilia candida, Tous ces organismes développent dans des liquides fermentescibles des végétations qui ressemblent beaucoup aux Saccharo-

---

liquide nourricier, ce qui ne pouvait se concilier avec ma tâche principale. D'ailleurs de pareilles recherches ont été exécutées récemment par M. Borgmann (Zur chemischen Charakteristik durch Reinculturen erzeugter Biere. Fresenius, Zeitschr. f. analyt. Chemie XXV, Heft IV, 1886, p. 532) et par M. Amthor (Studien über reine Hefen. Zeitschr. f. physiolog. Chemie XII, 1888, p. 64). Le résultat principal a été le même dans les deux cas, à savoir que les diverses espèces de Saccharomyces exécutent dans le moût de bière un travail chimique différent. Les levûres basses essayées dans les brasseries ont aussi, sous ce rapport, donné des résultats différents. Que les Saccharomyces, da_s les brasseries, exercent une action chimique différente, suivant qu'ils appartiennent à une espèce ou à une autre, cela résultait du reste déjà de mes recherches sur les maladies provoquées par eux dans la bière (Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg, II. vol., 2. liv., 1883, p. 52 et Zeitschr. f. das ges. Brauwesen, München 1884, p. 273). L'exactitude de la doctrine exposée dans ce dernier mémoire a été confirmée par M. Grønlund dans une étude expérimentale: »Ueber bitteren unangenehmen Beigeschmack des Bieres«. (Zeitschr. f. das ges. Brauwesen, München 1887, p. 469).

myces et ont souvent été confondues avec eux, mais qui s'en séparent nettement par ce caractère, qu'ils ne forment pas d'endospores. Quelques-uns peuvent développer un mycelium et une végétation plus ou moins abondante de moisissures, d'autres non.

Mycoderma cerevisiæ.

Nous avons relevé plus haut que les cellules de cette espèce sont très répandues. Dès que la bière, le vin ou des liquides analogues sont exposés à l'action directe de l'air, ils ne tardent pas à être recouverts d'un voile de ce mycoderme; la bière qui se trouve dans les froides caves de garde des brasseries n'en est pas même exempte. Comme on sait, il a aussi précisément reçu ces noms de Mycod. vini et de Mycod. cerevisiæ d'après la manière dont il se manifeste. Il ne fait fermenter aucun des sucres mentionnés plus haut et n'invertit pas non plus les dissolutions de saccharose.

Sacch. apiculatus.

Il a reçu son nom spécifique à cause de ses petites cellules en forme de citron; quant à son nom générique, il le porte à tort, comme nous l'avons fait observer plus haut, mais il est bien connu sous ce nom dans la littérature, et c'est pourquoi il doit aussi le garder jusqu'à ce qu'on puisse un jour, avec quelque sûreté, faire une nouvelle classification. Dans mes mémoires précédents[1]), j'ai montré que cette espèce ne produit dans le moût de bière qu'une faible fermentation, c. 1 vol. $^0/_0$ d'alcool. Les expériences que j'ai faites alors pour constater si elle pouvait ou non faire fermenter de la maltose faisaient déjà présager un résultat négatif, et en reprenant plus tard ce travail, j'ai trouvé la confirmation de ce résultat. Il résulte également de mes recherches ci-dessus mentionnées qu'elle n'invertit pas la saccharose et ne peut pas la faire fermenter.

Dans les dissolutions de dextrose à 15 et à 10 $^0/_0$ dans l'eau de levûre, il produit une fermentation assez active. Après 15 jours de repos à la température de 25^0 C., il a donné respectivemeut 2,8 et 2,6 vol. $^0/_0$ d'alcool, et après $1^1/_2$ mois, un peu plus de 3 vol. $^0/_0$, proportion qui ne s'est plus accrue, car après 3 mois, elle était encore la même. À la fin de l'expérience, les liquides renfermaient encore du sucre, ce qui prouve que le Sacch. apiculatus n'a pu pousser la fermentation jusqu'au bout. Dans une autre expérience faite à 25^0 C. avec 10 $^0/_0$ de dextrose dans l'eau de levûre, on a trouvé après 15 jours 3,7 et après 25 jours 4,3 vol. $^0/_0$ d'alcool.

[1]) Emil Chr. Hansen: Ueber Saccharomyces apiculatus (Hedwigia, 1880, p. 75) et surtout: Sur le Saccharomyces apiculatus et sa circulation dans la nature (Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg, I. vol. 1881, p. 159). Nouvelles recherches sur les rapports des cellules dans la nature (Botan. Centralblatt, B. XXI, 1885, Nr. 6).

Torula de M. Pasteur.

Nous arrivons au groupe de cellules de levûre que, suivant les remarques faites plus haut, nous avons appelé Torula. Dans un mémoire publié en 1883 dans cette revue, j'ai décrit 5 espèces de ce groupe. Je puis aussi mentionner que M. Roux, le collaborateur distingué de M. Pasteur, a, en 1881, étudié un organisme qui doit sans doute également s'y rattacher; il produisait une fermentation bien marquée dans les dissolutions de dextrose, mais pas dans celles de saccharose et de lactose, et n'avait pas d'invertine. D'autres auteurs ont fait plus tard des observations analogues.

De mes 5 espèces de Torula, deux seulement développaient de l'invertine, et c'est à peine si quelqu'une d'entre elles faisait fermenter la maltose; cependant ce n'est que leur action sur le moût de bière et les dissolutions de saccharose qui avait été déterminée directement, et lorsque, longtemps après, je voulus reprendre ces expériences, il n'y en avait plus au laboratoire, et je dus me procurer de nouveaux matériaux.

J'ai recueilli par hasard dans l'air la première des deux espèces nouvelles que je vais maintenant décrire. Les jeunes et vigoureuses végétations de cette espèce, cultivées comme il a été dit plus haut dans du moût de bière, se composent de petites cellules de levûre rondes et ovales, telles que les représente la Fig. 1.

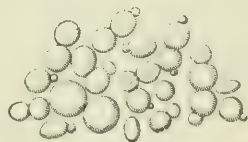


Fig. 1.

Dans le moût de bière, elles produisent une fermentation assez marquée et jusqu'à 1,3 vol. $^0/_0$ d'alcool, mais elles ne font pas fermenter les dissolutions de maltose. Elles invertissent la saccharose, et, dans les dissolutions à 10 et 15 $^0/_0$ de ce sucre dans l'eau de levûre, donnent après 14 jours, à c. 25^0 C., respectivement 5,1 et 6,2 vol. $^0/_0$ d'alcool. La culture dans le dernier liquide fut ensuite exposée pendant 2 mois à la température ordinaire d'un appartement; elle renfermait alors 7 vol. $^0/_0$ d'alcool et tout le sucre avait disparu.

Dans des conditions analogues et dans des dissolutions se composant d'eau de levûre avec 10 et 15 $^0/_0$ de dextrose, elles ont après 15 jours donné respectivement 6,5 et 8,3 vol. $^0/_0$ d'alcool. Après 2 mois d'exposition à la température indiquée ci-dessus, la première culture renfermait 6,6 et la seconde 8,5 vol. $^0/_0$ d'alcool. La fermentation était donc plus active dans les dissolutions de dextrose que dans celles de saccharose.

J'ai trouvé la seconde espèce nouvelle dans la terre sous des ceps de vigne, sur une montagne des bords du Rhin. La Fig. 2 en représente les cellules, qui ont été cultivées comme les précédentes. Elles ont plus souvent que ces dernières une forme ovale, et beaucoup d'entre elles sont notablement plus grandes.

Comme exemple de la formation des voiles chez les cellules de levûre des Torula, nous avons représenté, Fig. 3, la végétation d'un

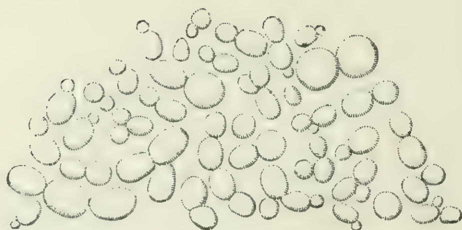


Fig. 2.

voile dans une culture, vieille de 10 mois, de cette seconde espèce dans du moût de bière. On voit que les cellules, comparées avec celles de la Fig. 2, sont souvent plus grandes, irrégulières et allongées en forme de boudin, caractères qui sont aussi ceux des voiles de même âge chez les Saccharomyces.

L'espèce dont il s'agit ne donne dans le moût de bière que 1 vol. $^0/_0$ d'alcool. Elle ne produit aucune fermentation dans la maltose; il en est de même de la saccharose, qu'elle n'invertit pas non plus.



Fig. 3.

Dans deux dissolutions de dextrose à 10 et 15 $^0/_0$ dans l'eau de levûre, à c. 25^0 C., elle a donné après 15 jours respectivement 4,6 et 4,5 vol. $^0/_0$ d'alcool. Après un mois d'exposition à la même température, la première renfermait 4,8 et la seconde 4,7 vol. $^0/_0$ d'alcool. Deux autres cultures pareilles qu'on avait laissées reposer beaucoup plus longtemps renfermaient, celle avec 10 $^0/_0$ de dextrose 4,8, et celle avec 15 $^0/_0$ de dextrose 5,3 vol. $^0/_0$ d'alcool; un repos plus prolongé n'a fait faire aucun progrès à la fermentation.

Au point de vue physiologique, cette espèce se distingue donc de la précédente non seulement par le manque d'invertine, mais aussi par la fermentation plus faible qu'elle produit dans les dissolutions de dextrose.

Très répandues dans la nature sont les formes de Torula qui n'ont pas d'invertine, et qui ne donnent dans les cultures dans le moût de bière que c. 1 vol. $^0/_0$ d'alcool, et par suite ne font pas fermenter la maltose.

Nous passerons maintenant à l'examen d'une moisissure que j'ai désignée sous le nom systématique de

Monilia candida.

J'ai déjà eu l'occasion, en 1883, de publier dans la revue zymotechnique de M. Fasbender une notice sur cette espèce, remarquable au point de vue physiologique. On la trouve dans la bouse fraîche de vache et dans les fissures des fruits doux et juteux. Cultivée dans le moût de bière ou d'autres liquides nourriciers sucrés, par exemple des dissolutions de dextrose et de saccharose avec addition d'eau de levûre, elle développe rapidement, à la température ordinaire d'un appartement, une vigoureuse végétation de cellules ressemblant à des Saccharomyces, que, d'après l'image donnée par le microscope, on pourrait surtout déterminer comme étant le Sacch. ellipsoïdeus ou le Sacch. cerevisiæ de Reess. — Voir Fig. 4.

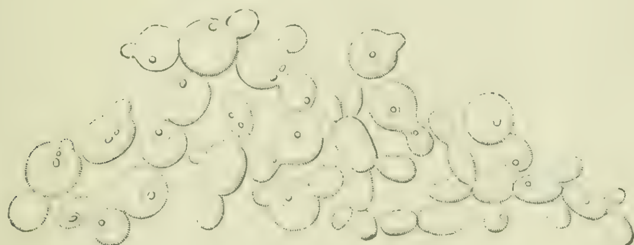


Fig. 4.

Des vacuoles contenant chacune un ou deux petits corps très réfringents sont fréquentes, et ces petits corps se meuvent en général en oscillant de côté et d'autre.

Dans les liquides ci-dessus mentionnés, cette espèce produit une fermentation alcoolique assez forte et, pendant que le dégagement d'acide carbonique est en pleine activité et que les bulles d'écume montent à la surface, elle forme déjà sur celles-ci un voile gris mat qui s'étend rapidement sur toute la surface et sur les parois du ballon qui renferme la liquide. La Fig. 5 montre les cellules pendant cette formation de voile. Les petits corps brillants mentionnés plus haut ne sont pas représentés dans cette figure ni dans la suivante.

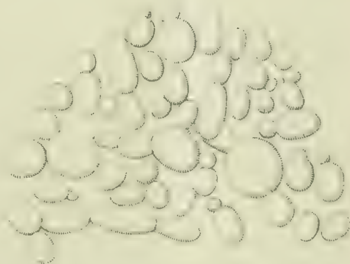


Fig. 5.

Laisse-t-on une pareille culture reposer pendant quelque temps, il se développe des cellules plus allongées

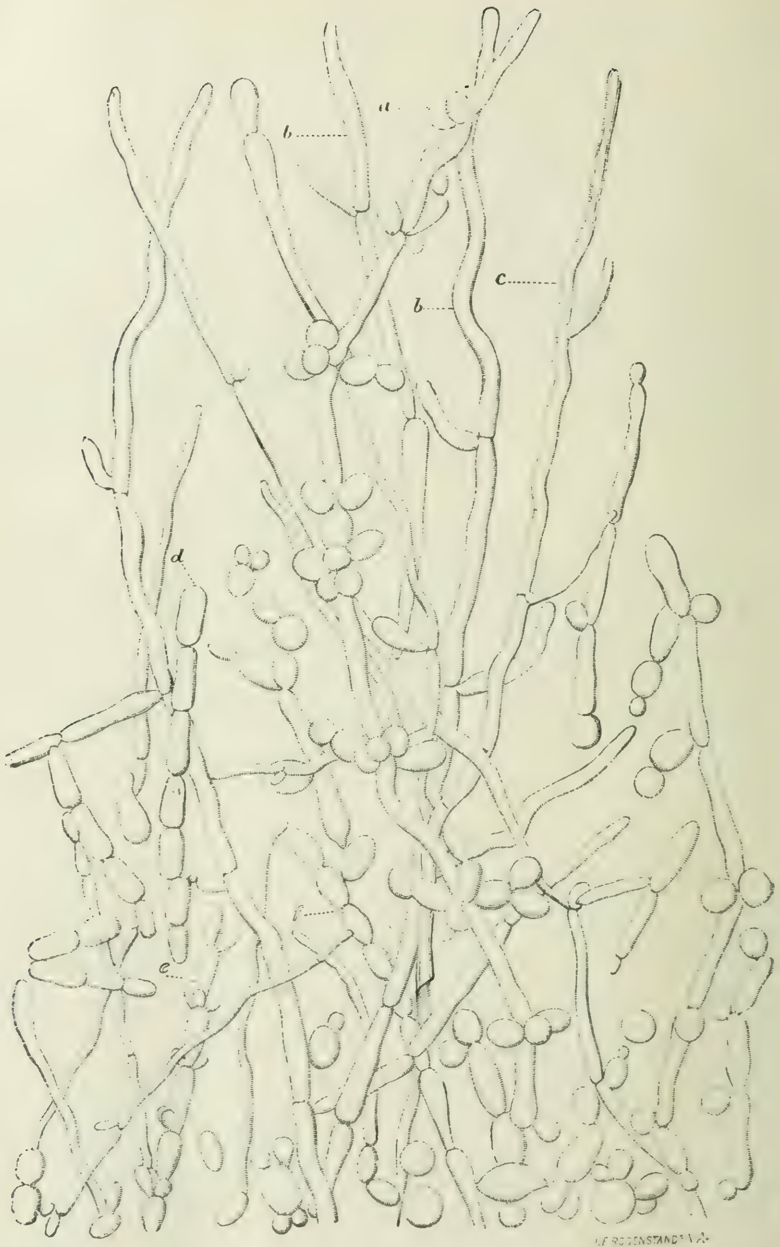


Fig. 6. Végétation de moisissures du Monilia candida.

Les formes comme *a* sont fréquentes; elles se composent de chaînes de cellules allongées, plus ou moins filiformes et assez faiblement unies entre elles: à chaque articulation,

et finalement un mycelium complet, uue végétation blanche, un peu duvetée de moisissures, qui produit des conidies de levûres ou se divise en articles comme les Oidium (Fig. 6). La même végétation s'est aussi développée sur des substrata nourriciers solides; mais bien que les cultures aient varié à un haut degré et été poursuivies pendant des années, je n'en ai jamais observé d'autre. Ces végétations sont dans tous les cas gris clair.

Dans sa végétation de moisissure, elle se rattache assez étroitement, du moins dans quelques cas, à la description et au dessin que Bonordon a donnés de son Monilia candida. C'est pourquoi j'ai choisi ce nom systématique pour mon espèce. Mais, comme c'est en général le cas lorsqu'il s'agit de descriptions de microorganismes faites par d'anciens auteurs, il est impossible de déterminer avec certitude quelle est l'espèce dont ils parlent. Les formes sous lesquelles se montre notre espèce sont en outre peu caractéristiques, et communes à beaucoup de champignons d'ailleurs différents entre eux. Il est donc facile de comprendre que, dans les herbiers de champignons, on trouve plusieurs espèces sous ce nom. On n'arrive pas non plus à résoudre mieux la question en allant chercher ce champignon dans le bois pourri, lieu où Bonordon l'a trouvé.

Tandis que M. Plaut, dans un premier travail, supposait que son champignon trouvé dans le bois pourri était identique avec mon Monilia, il est maintenant arrivé à un résultat tout différent[1]). Il est très vraisemblable que les auteurs qui, dans ces derniers temps, ont étudié des moisissures ressemblant au Monilia, ont opéré sur toute une série d'epèces différentes, et, à ce sujet, nous devons de nouveau faire observer que l'examen morphologique ne nous met pas en état de les distinguer les unes des autres. Comme on va le voir, l'espèce dont je me suis occupé est nettement caractérisée par ses particularités physiologiques, et ce sont aussi celles-là sur lesquelles, pour le moment du moins, il faut tout particulièrement s'appuyer.

Dans les mêmes circonstances où le Sacch. cerevisiæ (levûre basse des brasseries) produisait 6 vol. $^0/_0$ d'alcool, le Monilia candida en don-

[1]) Plaut: Neue Beitrage zur systemat. Stellung des Soorpilzes in der Botanik. Leipzig 1887.

on trouve ordinairement une couronne de cellules de levûre ovales qui tombent facilement. En *b* on voit une autre forme fréquente, mais qui se distingue de la précédente par l'absence des cellules disposées en couronne, lesquelles sont remplacées par une branche analogue à celle qui ferme la tige mère, mais plus courte. Il n'est pas rare que les articles qui forment ces chaînes soient étroitement unis entre eux. Dans beaucoup de cas, les étranglements disparaissent, et un mycelium tout à fait typique, avec des cloisons transversales distinctes, prend alors naissance *c*). Les formes *b* et *c* se trouvent dans le substratum nourricier correspondant, *a* en général à la surface. Les formes comme *d* ressemblent beaucoup à l'Oidium lactis. En *e*, on voit une chaîne de cellules pyriformes avec des couronnes de cellules de levûre qui ressemblent au Sacch. exiguus. La chaîne de cellules en forme de citron représentée en *f* est identique avec le dessin qu'Ehrenberg a publié de l'Oidium fructigenum (De Mycetogenesi. Pl. X). Entre les formss principales ainsi décrites se trouvent de nombreuses cellules de levûre de forme différente et en colonies diversement groupées. Comme d'habitude, il se produit aussi des formes comme le Sacch. conglomeratus Reess.

nait à peine $1^1/_2$: mais laissait-on la fermentation continuer plus longtemps, la quantité d'alcool allait en augmentant. Voici une des séries d'expériences que j'ai faites à cette occasion.

Trois ballons d'un litre à deux cols (modèle Pasteur) furent remplis aux $^3/_4$ de moût de bière stérilisé et infectés chacun avec 3 cent. cubes d'une levûre fluide assez épaisse de cellules jeunes et vigoureuses, qui pour l'un des ballons était de la levûre haute des brasseries, pour le second de la levûre basse des brasseries et pour le troisième de la levûre de Monilia candida. Il va sans dire que toutes les cultures étaient absolument pures, et le tout était disposé de manière que les ballons ne différaient entre eux que par le genre d'infection. Les expériences étaient faites à la température ordinaire d'un appartement.

Après 16 jours le ballon avec la levûre haute a donné 6 vol. $^0/_0$,
\- - - - - - la levûre basse — 6 - -
\- - - - - - le Monilia candida — 1,1 - -

Après 67 jours les ballons avec les deux premières espèces de levûre renfermaient encore 6 vol. $^0/_0$ d'alcool, mais il y en avait 2 dans le troisième ballon. Les deux levûres des brasseries avaient donc déjà au bout de 16 jours produit leur effet maximum; cela fut aussi confirmé lorsque, après 4 mois, je procédai à un nouveau dosage.

A cette époque, le Monilia candida n'avait encore donné que 3,4 vol. $^0/_0$,

après 6 mois, il en donna 5 vol. $^0/_0$,
\- $9^1/_2$ - - - - 6,5 - -
\- 26 - - - - 6,7 - -

Ce fut le maximum, car les cellules étaient mortes lorsque je fis cette dernière expérience.

Il résulte de ces recherches ainsi que d'autres analogues que le Monilia candida, contrairement à ce qui a lieu en général chez les Saccharomyces, n'atteint que très lentement les fortes proportions pour cent d'alcool dans les circonstances ci-dessus décrites. Sous ce rapport, il se comporte comme plusieurs Mucorinees, voir p. 160.

La cause de cette lente fermentation provient en partie de la température relativement basse à laquelle on a opéré; prend-on une température plus élevée, 25^0 C. par exemple, le résultat est tout autre, la fermentation devenant alors beaucoup plus active.

Il suit des expériences qui précèdent que cette espèce doit être de celles qui font fermenter la maltose, et on peut aussi le vérifier directement. Dans une dissolution de maltose à 5 $^0/_0$ dans l'eau de levûre, elle a, après quelques jours et à 20^0 C., produit une active fermentation, et au bout de 42 jours tout le sucre avait disparu, tandis que le liquide contenait 2,6 vol. $^0/_0$ d'alcool. Par contre, une expérience faite de la même manière, mais avec une dissolution de maltose dans de l'eau pure, n'a donné aucun signe de fermentation ni aucune réaction de l'alcool; par conséquent il ne s'était pas produit de fermentation alcoolique. Le réfractomètre a cependant accusé la disparition d'une petite portion du sucre et le liquide avait une réaction acide; je suis donc disposé à

croire que la maltose disparue a exclusivement servi à la multiplication et à l'alimentation des cellules. Après avoir ensuite ajouté un peu d'eau de levûre et placé le ballon dans le thermostat à 25° C., il se produisit une assez forte fermentation qui transforma tout le sucre. Le liquide donnait aussi alors nettement les réactions de l'alcool.

Il semble donc que le Monilia candida peut bien se multiplier dans une dissolution aqueuse pure de maltose, mais non y déterminer une fermentation aussi longtemps qu'on ne lui fournit pas les matières azotées et les sels nourriciers nécessaires. Une fermentation de maltose demande aux cellules un travail plus grand qu'une fermentation de glucose, et par suite, elles doivent, dans le premier cas, avoir une alimentation meilleure que dans le second. Comme on se le rappelle, il y a quelques années que fut souvent agitée la question de savoir si la maltose était ou non directement fermentescible. Le Monilia candida nous fournit une nouvelle contribution à sa solution, car nous avons dans cet organisme une levûre qui, bien que privée de ferments invertifs, peut cependant produire dans les dissolutions de maltose une fermentation assez active quoique lente. Il suit de là qu'une transformation préalable de ce sucre en dextrose n'est en tout cas pas nécessaire pour qu'il puisse subir une fermentation alcoolique.

Nous voici arrivé au caractère le plus intéressant de cette levûre alcoolique. Bien que, comme il a été dit plus haut, elle soit privée du ferment soluble, l'invertine, elle fait cependant fermenter la saccharose. Jusqu'ici en effet, la saccharose, dans la chimie et la physiologie moderne, a été rapportée aux espèces de sucre qui ne sont pas directement fermentescibles.

Les expériences que j'ai entreprises à ce sujet ont été faites dans des ballons à deux cols avec des dissolutions stérilisées de sucre de canne à deux cols avec des dissolutions stérilisées de sucre de canne à 10 et 15 %, en partie avec, en partie sans addition de combinaisons azotées et de sels nourriciers. Dans le dernier cas, la fermentation était accompagnée de peu d'écume, tandis que, dans le premier, il s'en produisait une grande quantité. Dans différentes phases de la fermentation, on a pris des échantillons du liquide pour les analyser et a toujours constaté que le sucre restant était de la saccharose; il n'y avait pas la moindre trace de sucre inverti, et en conséquence on n'a pas non plus trouvé de l'invertine dans l'extrait de levûre dans l'eau et dans la glycérine. Nous possédons donc réellement une levûre alcoolique qui est en état de faire fermenter la saccharose sans inversion préalable, d'où il suit en même temps que ce sucre, dans certaines circonstances, est directement fermentescible.

Parmi les expériences faites à différentes époques pour résoudre cette question, nous citerons les suivantes;

Un ballon à deux cols, renfermant une dissolution a 10 % a été largement infecté avec une levûre entre les cellules de laquelle il y avait un peu du liquide nourricier où elles avaient pris naissance.

Après	20 jours	il s'était formé	0,7 vol. % d'alcool,
-	2 mois	- - -	1,35 - - -
-	4 -	- - -	2,25 - - -
-	6 -	- - -	3 - - -

Après 8 mois il s'était formé 3,7 vol, $^{0}/_{0}$ d'alcool,
- 12 - - - - 4,5 - - -
- 27 - - - - 4,9 - - -

Le liquide en fermentation a de plus été essayé avec du papier de tournesol, avec le réactif de Fehling et dans un appareil de polarisation, après avoir reposé 20 jours et 8,12 et 27 mois. Il avait toujours une réaction acide, mais ne réduisait pas; par contre, le faisait-on chauffer avec de l'acide chlorhydrique faible, il se produisait un précipité abondant de protoxyde de cuivre rouge, et il tournait constamment à droite le plan de polarisation. De là on doit conclure qu'il restait toujours de la saccharose et que l'acide formé pendant la fermentation n'a pu l'invertir. Les cellules vieilles de 27 mois étaient encore vivantes quand on les a essayées.

Dans une autre expérience, on s'est servi d'une dissolution de sucre de canne à 15 $^{0}/_{0}$, et les cellules de levûre qu'on y a mêlées ont, au préalable, été lavées avec soin avec de l'eau stérilisée pour les débarrasser de toute trace de liquide nourricier.

Après 4 mois on a trouvé 1,1 vol. $^{0}/_{0}$ d'alcool,
- 12 - - - - 2,7 - - -
- 16 - - - - 2,8 - - -

On s'est également assuré, dans ce cas, qu'aucune inversion n'a eu lieu pendant toute la durée de l'expérience, qui, de même que la précédente, a été faite à la température ordinaire d'un appartement.

Lorsque le Monilia candida est cultivé pendant longtemps à de hautes températures, par exemple aux environs de 40^{0} C., il est très porté, surtout en cas d'alimentation insuffisante, à produire une abondante formation d'acide. Y a-t-il alors de la saccharose dans le liquide, il pourra en être inverti une partie plus ou moins grande, mais cela n'a rien à faire avec une sécrétion d'invertine.

Les liquides dont on s'est servi dans les expériences de fermentation ci-dessus mentionnées ont de temps à autre été soumis à des recherches ayant un but différent. Il a ainsi été constaté que le gaz qui se dégageait pendant la fermentation était de l'acide carbonique, et que le produit de la distillation donnait toujours les réactions de l'alcool éthylique. A l'état anhydre, son indice de réfraction était 1,361, son point d'ébullition, 79^{0} C. et sa densité à 17,5^{0} C., 0,795.

Le Monilia candida se distingue de plusieurs autres levûres alcooliques par sa facilité à supporter l'action de hautes températures. Dans le moût de bière et dans un mélange de sucre de canne et d'eau de levûre, il s'est, par exemple, vigoureusement développé à 40^{0} C. en produisant une active fermentation. Bien qu'il forme très facilement des voiles, il ne peut cependant se développer dans les liquides spiritueux comme le Mycod cerevisiæ: semé dans de la bière à fermentation basse, il n'a en effet jamais formé un voile complet et son développement était faible. Relativement à plusieurs détails concernant tant cette espèce que les précédentes, je me réfère au texte danois.

Résultats.

Nous voici arrivé à la fin de ce groupe de microorganismes ressemblant à des Saccharomyces, mais sans endospores. Il n'y a qu'un petit nombre de ces espèces dont la puissance fermentative puisse se comparer avec celle des vrais Saccharomyces, et aucune s'il s'agit de faire fermenter la maltose. Parmi les 10 qui ont été examinées, il en a seulement été trouvé une (le Monilia candida) qui fit fermenter les dissolutions de ce sucre. C'était également chose ordinaire que de rencontrer des espèces complètement incapables de provoquer la fermentation alcooliquee; il en est tout autrement des Saccharomyces, car parmi eux nous n'avons trouvé qu'une seule espèce (le Sacch. membranæfaciens) qui ne fût pas doué de cette faculté, et, dans le grand groupe des autres, qu'un petit nombre (le Sacch. Marxianus, le Sacch. exiguus et quelques autres) qui ne fissent pas fermenter la maltose.

Tandis que, dans ce dernier genre riche en espèces, l'absence de la faculté de provoquer la fermentation alcoolique est accompagnée du manque d'invertine, et n'a été observée que chez le Sacch. membranæfaciens, il est au contraire fréquent, parmi les microorganismes examinés ici, de rencontrer des espèces qui n'ont pas d'invertine et qui néanmoins produisent la fermentation alcoolique. Dans le nombre, le Monilia candida est cependant le seul qui puisse faire fermenter la saccharose comme telle, et c'est là l'observation la plus remarquable que nous ayons faite. Si nous considérons les deux fonctions, la production de l'invertine et la fermentation, nous voyons que toutes les combinaisons possibles ont lieu dans cette section, il y a des espèces chez qui ces deux fonctions font défaut, des espèces chez qui on les trouve toutes deux et enfin des espèces chez qui l'une d'elles se trouve et l'autre fait défaut.

Tandis que la plupart des Saccharomyces jouent un grand rôle dans l'industrie, ce groupe de non-Saccharomyces a sous ce rapport très peu d'importance. Les nombreuses espèces douées d'un faible pouvoir fermentatif ne peuvent guère, dans ces circonstances, être prises en considération, et comme on n'en connaît qu'une seule, le Monilia candida, qui fasse fermenter la maltose et encore sans grande énergie, il faut les regarder comme étant sans importance pratique dans l'exploitation des brasseries et des distilleries. Des grands bacs refroidisseurs découverts, dans les brasseries, ils viennent toute l'année avec le moût dans les cuves à fermentation, et peuvent à la longue s'y trouver en quantité notable, mais on n'a constaté de leur part aucune action nuisible.

Comme toutes les levûres alcooliques examinées jusqu'ici, les espèces douées d'un pouvoir fermentatif attaquent avec facilité les dissolutions de dextrose et de sucre inverti; il est donc très vraisemblable que quelques-unes du moins prennent une part plus ou moins notable dans la fermentation des vins de raisins et d'autres fruits.

Dans ce groupe, on a encore trouvé en plus grand nombre que dans le précédent des exemples de cette particularité, que des espèces qui, au point de vue morphologique, ne peuvent être distinguées les unes des autres, se montrent cependant toutes différentes dans leur action sur les sucres, de sorte qu'elles se laissent par là nettement caractériser.

Toutes ces espèces développent des végétations de cellules de levûre, il n'y en a qu'un petit nombre qui se comportent en même temps comme des moisissures en produisant un mycelium complet.

4. Mucor.

Lorsqu'on entreprend une étude détaillée des nombreuses espèces appartenant à ce genre, on s'aperçoit non seulement qu'il n'y en a qu'un petit nombre qui ont été examinées jusqu'ici, mais en même temps que les descriptions dont on dispose sont en général insuffisantes pour décider avec certitude si une forme donnée est décrite ou non; il règne même de l'incertitude sur le Mucor Mucedo et le Mucor racemosus, espèces qui sont si souvent mentionnées dans la littérature.

Mucor erectus. Bainier.

Sous ce nom, j'ai reçu de M. le Dr Eidam une moisissure qui s'accorde assez exactement avec les descriptions systématiques du Mucor racemosus, et qui certainement appartient aux espèces qu'on à confondues avec lui. M. Eidam l'a trouvée en juillet dans son laboratoire sur des pommes de terre pourries.

Le Mucor erectus appartient aux levûres alcooliques énergiques du genre et, sous un certain rapport, l'emporte même sur la levûre basse ordinaire des brasseries. Cultivé dans le moût de bière, à la température ordinaire d'un appartement, il a donné:

après	14 jours	1,7	vol. % d'alcool,
-	$1^1/_2$ mois	6	- - -
-	$2^1/_2$ -	8	- - -

Des cultures analogues à 25° C, ont donné;

après	14 jours	1,8	vol. % d'alcool,
-	$1^1/_2$ mois	5,8	- - -
-	$2^1/_2$ -	7	- - -

Contrairement à ce que nous avons observé chez le Monilia candida, une température plus élevée n'a donc pas augmenté l'énergie de la fermentation chez cette espèce.

Comme on pouvait s'y attendre, il produit aussi la fermentation alcoolique dans lès dissolutions de maltose, mais non pas dans celles de saccharose, et ne les invertit pas non plus.

Dans une dissolution de dextrose à 10 % dans l'eau de levûre, il a donné:

après	4 jours	1,8	vol. % d'alcool,
-	15 -	3,5	- - -

Mucor spinosus. van Tiegh.

Sous ce nom, M. van Tieghem désigne un Mucor dont la columelle est munie de saillies d'épines et souvent irrégulières.

Dans des expériences faites à 22^0 C., avec du moût de bière comme liquide nourricier, il a donné:

après	4 jours	0,5	vol.	$^0/_0$	d'alcool,
-	1 mois	2,8	-	-	-
-	2 -	4	-	-	-
-	5 -	4,8	-	-	-
-	$6^1/_2$ -	5,4	-	-	-

Dans une autre culture analogue, on a trouvé après 1 an de repos à la température ordinaire d'un appartement, 5,5 vol. $^0/_0$ d'alcool,

M. Gayon dit que le Mucor spinosus ne peut produire plus de 1—2 vol. $^0/_0$ d'alcool dans le moût de bière; la différence entre ses déterminations et les miennes doit sans doute être due à la circonstance qu'il n'a pas poursuivi assez longtemps son expérience.

Une culture dans une dissolution de maltose a donné rapidement des signes bien distincts de fermentation, et renfermait après 8 mois 3,4 vol. $^0/_0$ d'alcool.

Dans les dissolutions de sucre de canne, il n'a produit ni fermentation ni inversion.

Après avoir été cultivé pendant 15 jours à 25^0 C, dans une dissolution de dextrose à $10^0/_0$ dans l'eau de levûre, il a donné 2 vol. $^0/_0$ d'alcool.

Cette espèce a donc, dans tous les essais, développé une énergie fermentative moins grande que la précédente.

Mucor Mucedo. L.

La végétation avec laquelle j'ai fait mes expériences a été prise sur du crottin frais de cheval.

Après 15 jours de culture à 23^0 C. dans du moût de bière, elle a donné 0,4 vol. $^0/_0$ d'alcool. Dans une culture analogue, mais faite à la température ordinaire d'un appartement, on a trouvé:

après	$2^3/_4$ moins	1	vol.	$^0/_0$	d'alcool,
-	6 -	3	-	-	-

Une ballon de cette culture, après un séjour de 1 an dans le laboratoire, ne renfermait que 3,1 vol. $^0/_0$; la formation d'alcool semble donc, dans ces circonstances, avoir atteint son maximum.

Elle a produit une fermentation faible mais distincte dans un liquide nourricier composé de 5 $^0/_0$ maltose dans l'eau de levûre.

Dans une dissolution de dextrose à $10^0/_0$ dans l'eau de levûre, elle a donné:

après	15 jours à 25^0 C.	0,5	vol.	$^0/_0$	d'alcool,
-	$1^1/_2$ mois - - -	0,8	-	-	-

Elle ne développait pas d'invertine et ne faisait pas fermenter les dissolutions de saccharose. mais, comme plusieurs autres espèces de Mucor. elle y produisait une vigoureuse végétation.

D'après les recherches qui précèdent, cette espèce appartient aux faibles levûres alcooliques. Les quantités d'alcool que j'ai trouvées avec le moût de bière et les dissolutions de dextrose s'accordent bien avec celles que MM. Brefeld et Fitz ont indiquées. Quant à l'action sur la maltose, le présent mémoire est le premier qui en ait parlé.

Nous passons maintenant à une espèce qui se distingue nettement des précédentes par ce caractère, qu'elle développe de l'invertine.

Mucor racemosus. Fres.

Cette espèce est comme la précédente très répandue et a des habitats analogues.

Dans des cultures au moût, à la température ordinaire d'un appartement, elle a donné:

après	14 jours	1,3	vol. %	d'alcool.
-	3 mois	4,7	- -	-
-	12 -	7	- -	-

Comme il fallait s'y attendre, elle fait aussi fermenter la maltose. mais elle produit tout aussi peu que les autres espèces de Mucors des phénomènes bien marqués de fermentation dans une dissolution de ce sucre.

Dans la dissolution de dextrose à 10% dans l'eau de levûre. elle a donné à 25° C.:

après	14 jours	1,5	vol. %	d'alcool,
-	1½ mois	2,6	- -	-

Il a été dit plus haut qu'elle développe de l'invertine; par suite, elle peut aussi transformer le sucre de canne en sucre inverti et le faire alors fermenter.

Dans une expérience faite à 25° C. avec 10% de sucre de canne dans l'eau de levûre, on a ainsi trouvé:

après	14 jours	1,1	vol. %	d'alcool,
-	1½ mois	2,3	- -	-

Mes résultats s'accordent, en tant qu'une comparaison est possible, assez exactement avec ceux de MM. Pasteur et Fitz. De même que ce dernier et plus tard M. Brefeld, j'ai aussi observé que le Mucor racemosus développe de l'invertine. L'exactitude de ce caractère a cependant été mise en doute par des physiologues français.

Outre le M. racemosus, j'ai aussi trouvé une autre espèce ou variété qui développe de l'invertine. J'ai en même temps eu l'occasion d'entreprendre des recherches plus ou moins détaillées sur d'autres espèces que les précédentes. Quant aux points principaux, elles se comportent toutes comme le groupe ci-dessus décrit: aucune ne fait fer-

menter la lactose ni la saccharose, et ne développe de l'invertine: elles produisent toutes une fermentation nettement accusée dans les dissolutions de dextrose et de maltose, mais quelques-unes cependant ne donnent que de faibles quantités d'alcool.

Résultats.

Relativement à son action sur les sucres, ce genre se distingue donc en ceci, que la plupart de ses espèces ne développent pas d'invertine, et que toutes, en tant qu'elles provoquent une fermentation alcoolique nettement accusée, font fermenter la maltose; leurs fermentations sont lentes et ce n'est qu'après un temps relativement long qu'elles produisent leur plus grande proportion $^0/_0$ d'alcool. Si nous comparons le pouvoir fermentatif des espèces, nous trouvons bientôt qu'il y a entre elles une grande différence. Parmi celles qui ont été le mieux étudiées, le Mucor erectus et le Mucor mucedo forment, sous ce rapport, les deux points extrêmes. Tandis que le premier a donné dans le moût de bière jusqu'à 8 vol. $^0/_0$ d'alcool, le second n'en a produit que 4, et il y en a plusieurs qui sont au-dessous de ce dernier, même quelques-uns qui, à proprement parler, ne peuvent pas être appelés des levûres alcooliques.

Les levûres vigoureuses appartenant à ce genre envoient en général, pendant la fermentation, leur mycelium, leur chlamydospores et leurs cellules à la surface du liquide, et produisent par suite des phénomènes de fermentation haute. Aucune de ces espèces n'est employée dans l'industrie.

5. **Oidium lactis.** Fres.

De même que quelques-unes des espèces mentionnées dans ce qui précède, celle-ci ne peut non plus, à vrai dire, être rapportée aux levûres alcooliques; en tout cas, elle ne donne pas de fermentation bien accussée dans les circonstances où il s'en produit une telle lorsqu'on opère avec des Saccharomyces ou autres levûres alcooliques typiques.

Après 2 jours de culture dans le moût de bière à 25^0 C., le liquide ne donnait encore ni la réaction de l'iodoforme ni la réaction de larmes de M. Pasteur, ce n'est qu'au bout de 5 jours que ces réactions ont montré qu'il s'était formé une trace d'alcool. Un dégagement sensible d'acide carbonique avec formation d'écume n'a été observé ni dans cette expérience ni dans les suivantes.

Cette espèce fait tout aussi peu fermenter les dissolutions de maltose et de saccharose que celles de lactose. Elle ne développe pas non plus d'invertine

Une culture de dextrose à $10^0/_0$ dans l'eau de levûre, après avoir été exposée pendant 4 jours à la température de 25^0 C. n'a donné aucun

signe de formation d'alcool: après 7 jours, on a enfin constaté une forte réaction avec l'iodoforme et une faible avec le procédé Pasteur.

M. Brefeld est en somme arrivé au même résultat[1]).

6. Récapitulation.

Arrivé à la fin de cette série de recherches, nous essaierons comme d'habitude d'en résumer les principaux résultats sous une forme facile à embrasser.

Nous avons appris sur le genre Saccharomyces que les espèces dont il se compose se divisent en deux groupes principaux, suivant qu'elles développent de l'invertine et produisent la fermentation alcoolique, ou qu'elles ne possèdent pas ces propriétès; dans ce dernier, il n'a été trouvé qu'une seule espèce, le Sacch. membranæfaciens, p. 147. Toutes les espèces du premier groupe produisent une active fermentation alcoolique dans les dissolutions de saccharose et de dextrose et développent de l'invertine; elles se subdivisent en deux sections, dont l'une n'en compte qu'un petit nombre (Sacch. Marxianus, p, 145, Sacch. exiguus et quelques autres, p. 146) qui ne font pas fermenter la maltose, tandis que l'autre en comprend la grande majorité, qui produit aussi une active fermentation dans les dissolutions de ce sucre (p. 144).

Dans le chapitre suivant (p. 149) on a, pour des raisons pratiques, comparé une série d'espèces appartenant à différentes divisions encore indéterminées du système. Comme caractère commun à toutes, leur bourgeonnement ressemble à celui des Saccharomyces et elles n'ont pas d'endospores. Au point de vue physiologique, elles se distinguent de ce genre en ceci, qu'une seule de ces nombreuses espèces, le Monilia candida (p. 153), peut faire fermenter la maltose, et encore sans grande énergie. Les espèces qui n'ont pas d'invertine et celles dont le pouvoir fermentatif est très faible ou nul sont fréquentes. Plusieurs produisent une forte fermentation dans les dissolutions de dextrose et de sucre inverti, et chez le Monilia candida a été faite cette interessante observation, qu'il fait fermenter la saccharose comme telle, par conséquent sans inversion préalable. Si nous considérons ces denx fonctions, production d'invertine et de fermentation, nous observons que ces microorganismes présentent à cet égard toutes les combinaisons possibles; il y en a quelques-uns qui ne remplissent aucune de ces fonctions, d'autres chez qui elles sont toutes deux réunies, et d'autres enfin chez qui l'une d'elles se trouve et l'autre fait défaut (p. 151).

Le troisième groupe que nous avons étudié ne comprend, comme le premier, que des espèces appartenant à un seul genre, le genre Mucor (p. 160). Au point de vue physiologique, elles se divisent en deux groupes bien tranchés suivant qu'elles renferment de l'invertine ou, ce

[1]) De même que pour tant d'autres microorganismes, les opinions sont très partagées sur la nature de cette espèce. Mes travaux antérieurs à ce sujet se trouvent dans »Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg«, I Vol. 2 Liv. 1879, p. 75 et I Vol. 4 Liv. 1882, p. 214.

qui est le cas pour la plupart, qu'elles sont privées de ce ferment. Elles se distinguent en ceci, que, en tant qu'elles produisent une fermentation alcoolique nettement accusée, elles font aussi fermenter la maltose, quoique, à la vérité, assez faiblement. De même que chez le groupe précédent, elles présentent de très grandes différences dans leur pouvoir fermentatif, et il y a aussi des espèces qui, à vrai dire, ne peuvent pas du tout être appelées des levûres alcooliques.

L'Oidium lactis (p. 163) appartient aussi à cette dernière catégorie.

L'examen de nos microorganismes au point de vue de leurs rapports avec l'industrie fait ressortir nettement ce fait, que le genre Saccharomyces seul renferme des espèces qui peuvent produire dans les dissolutions de maltose une fermentation rapide et énergique. Le moût de bière et le moût de distillerie, comme on sait, contiennent principalement cette espèce de sucre. Les brasseries et les distilleries doivent donc chercher leurs levûres parmi les vrais Saccharomyces, mais ces études nous ont encore appris (p. 148) que toutes les espèces ne peuvent pas exécuter le travail chimique dont on a besoin, et qu'il faut faire entre elles un choix méthodique. On verra dans le mémoire suivant quels importants résultats pratiques ont été obtenus par ce moyen.

Les microorganismes ressemblant à des Saccharomyces, mais sans endospores (par conséquent autres que des Saccharomyces) dont il a été question dans le chapitre troisième, et qui, à une exception près, ne font pas fermenter la maltose, ne peuvent par suite guère être appelés à jouer un rôle important dans les brasseries et les distilleries, mais bien dans la fabrication du vin de raisins et d'autres fruits, comme il y en a plusieurs qui, dans les dissolutions de dextrose et de sucre inverti, provoquent une fermentation tout aussi active que les Saccharomyces. Parmi les principales levûres qui déterminent la fermentation du vin, il y en a probablement quelques-unes qui appartiennent à ce groupe. Mais cette question si importante pour l'industrie vinicole n'a pas encore été étudiée, et on ne peut donc, pour le moment, rien dire de positif à cet égard. M. Pasteur, qui est la source principale, n'a pu donner aucun renseignement sur ce point, comme il ne distingue nulle part entre les Saccharomyces et les non Saccharomyces.

Relativement aux espèces du genre Mucor, il y a seulement à faire remarquer qu'aucune n'est employée au service de l'industrie; il en est de même quant à l'Oidium lactis.

Après avoir considéré nos microorganismes dans leur action sur les quatre espèces de sucre, il ne sera pas sans intérêt de faire voir comment chacun de ces sucres se comporte.

Nos expériences montrent qu'il n'y a aucun exemple que la maltose ait subi quelque transformation par l'action de l'invertine des microorganismes (la plupart des Saccharomyces et du Mucor racemosus); dans les cas où il s'est produit une fermentation, nous devons donc admettre qu'elle a été directe, d'autant plus que plusieurs des espèces qui font fermenter ce sucre ne renferment pas d'invertine (Monilia candida et toutes les levûres alcooliques jusqu'ici examinées du genre Mucor, à l'exception du Mucor racemosus). Souvent il ne se produit aucune fermentation de ce sucre (Sacch. Marxianus, Sacch. exiguus et

quelques autres Saccharomyces, le Sacch. apiculatus et les espèces du genre Torula).

Relativement à la saccharose, nous avons vu que, sous l'action des levûres alcooliques, elle fermente soit directement sans inversion préalable (Monilia candida). soit indirectement après avoir été transformée en sucre inverti (la plupart des Saccharomyces. quelques espèces de Torula et le Mucor racemosus), ou ne fermente pas du tout (Sacch. apiculatus, quelques espèces de Torula et la plupart des espèces du genre Mucor).

La troisième espèce de sucre, la dextrose, est la seule que toutes nos levûres alcooliques aient sans exception fait fermenter, et dans les cas où une comparaison a été établie, nous avons toujours constaté qu'elle fermentait plus rapidement et avec plus d'énergie que la saccharose et la maltose. Cette observation a aussi son intérêt pour les méthodes de culture, car il en résulte que lorsqu'il s'agit de cultiver quelque espèce inconnue, on est plus sûr d'arriver au but en employant la dextrose.

Pour ce qui regarde la lactose, nous avons déjà relevé au commencement de ce mémoire que, parmi toutes les levûres alcooliques jusqu'ici connues, il n'y en a qu'une seule qui la fasse fermenter (p. 144).

Il est évident que les résultats ainsi acquis peuvent aussi avoir leur importance pour la chimie analytique, par exemple lorsqu'il s'agit d'analyser des dissolutions renfermant plusieurs espèces de sucre. On ne possède encore aucune détermination exacte, ni qualitative ni quantitative, du contenu en sucre du moût de bière. Dans les ouvrages de zymotechnie, il n'est question que de la maltose et tout le sucre est rapporté à cette espèce. Que cependant ce ne soit pas bien exact, c'est ce que savent tous les chimistes qui ont fait des recherches dans ce domaine. Si nous considérons la série des levûres alcooliques qui ne font pas fermenter les dissolutions de maltose (Sacch. Marxianus, Sacch. exiguus, Sacch. appiculatus et les espèces de Torula), nous voyons que, dans le moût de bière employé dans nos expériences, elles ont en général produit 1 vol. $^0/_0$ d'alcool, La quantité de sucre correspondante est ordinairement comptée comme appartenant à la maltose, ce qui naturellement est inexact. On pourrait, du moins dans plusieurs cas, obtenir un résultat plus exact en s'aidant des levûres alcooliques ci-dessus mentionnées.

Une des principales questions qui reviennent dans toutes mes études sur les levûres alcooliques est celle des espèces et de leur délimitation. Elle a également, dans le présent mémoire, été l'objet d'une attention spéciale. Nous avons vu que les espèces d'un même genre peuvent aussi, dans leur action sur les sucres, présenter des différences constantes et bien accusées, et il en a été donné des exemples dans chacun de nos trois grands groupes.

Nous avons ainsi obtenu des preuves nombreuses que les levûres alcooliques se comportent à cet égard d'une manière différente. Les différences observées trouvent, dans quelques cas, une explication provisoire dans la circonstance que telle ou telle levûre développe de l'invertine ou ne possède pas ce ferment. mais le plus souvent nous ne

pouvons en donner aucune explication et en sommes réduit à observer des faits. Tout aussi peu que nous comprenons pourquoi deux cellules qui, sous le microscope, sont parfaitement identiques dans leur activité physiologique, peuvent cependant être si différentes que l'une d'elles, par ex., développe de l'invertine et l'autre non, tout aussi peu sommes-nous en état de comprendre pourquoi une cellule de levûre peut faire fermenter la maltose, tandis qu'une autre d'un aspect tout semblable ne le peut pas; en un mot, notre science ne nous permet pas de mettre les fonctions en rapport avec quelque chose appartenant à la cellule elle-même. Aucune des théories qu'on a données jusqu'ici de la fermentation ne nous renseigne sur ces questions fondamentales. Ce sont les grands problèmes, encore entièrement obscurs, de la nature du protoplasme que nous rencontrons ici, mais des problèmes qui ne peuvent être soustraits plus longtemps à une recherche expérimentale. On ne saurait guère non plus imaginer d'objet se prêtant mieux à une pareille étude que les cellules de levûre, dont la structure est si simple et les fonctions relativement peu nombreuses. Les recherches faites jusqu'ici se meuvent donc, vues de près, toujours encore à la surface, et elles acquièrent seulement une portée plus grande, en tant qu'elles constituent des travaux préliminaires en vue du nouveau qui doit venir.

Décembre 1887.

RECHERCHES FAITES DANS LA PRATIQUE DE L'INDUSTRIE DE LA FERMENTATION.

PAR

EMIL CHR. HANSEN.

> Rien n'est plus agréable aux hommes voués à la carrière des sciences que d'accroîte le nombre des découvertes, mais quand l'utilité pratique de leurs observations est immédiate, leur joie est au comble.
>
> Pasteur (Études sur le vinaigre).

I.

INTRODUCTION.

Des études expérimentales sur les microorganismes conduisent facilement à des problèmes pratiques qui intéressent, d'une part, la médecine et, de l'autre, l'industrie. Dans ce domaine, les problèmes théoriques et pratiques se présentent de front et ne peuvent souvent être séparés. Tel a aussi été le cas pour mes travaux, et ce caractère, déjà marqué dans mes premières publications de 1878, ressort encore plus clairement dans la série des mémoires que j'ai publiés, depuis 1881, sous le titre de »Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques«. Quelques-uns ont principalement un intérêt théorique; d'autres, au contraire, entrent directement dans la pratique de l'industrie de la fermentation. Ils ont ainsi un double cachet et, suivant que l'un ou l'autre prédomine, ils acquièrent de la valeur pour les deux classes de lecteurs pour lesquels ils sont écrits: les hommes de science, qui cherchent des reseignements théoriques, et les praticiens, qui désirent d'organiser leur exploitation d'après des principes rationnels et d'obtenir un rendement matériel plus élevé.

Ces considérations m'ont engagé à publier dès à présent mes mémoires en deux séries, les recherches théoriques continuant à paraître dans l'ancienne série, tandis que celles qui ont directement une application pratique en formeront une nouvelle sous le titre indiqué plus haut.

Le fondateur du fonds et du laboratoire de Carlsberg, feu M. J. C. Jacobsen, m'avait déjà, il y a quelques années, engagé à plusieurs reprises à publier de pareils écrits à l'usage des praticiens, non seulement en Danois pour les lecteurs scandinaves, mais en même temps en Allemand, pour qu'ils pussent se répandre dans les pays où l'industrie de la fermentation s'est depuis longtemps tout spécialement développée. J'avais aussi promis de le faire; mais de nouvelles recherches qui se présentaient sans cesse m'en ont empêché jusqu'ici. C'est seulement maintenant, après la mort de M. Jacobsen, que je suis à même de tenir ma promesse.[1])

En publiant donc à l'avenir mes travaux physiologiques sur les fermentations dans les deux séries ci-dessus mentionnées, je dois de nouveau rappeler ce que j'ai fait observer au commencement de cette introduction, à savoir que les études théoriques et pratiques ne peuvent en réalité pas être rigoureusement séparées. Si le praticien désire se rendre parfaitement compte des recherches qui ont surtout été écrites pour lui, il devra en étudier la théorie, et réciproquement le physiologue et le mycologue pourront aussi trouver dans ma nouvelle série des renseignements servant à compléter mes études plus théoriques.

J'ai, pour ce travail, trouvé un guide dans les questions qui successivement m'ont été adressées de différents côtés; j'en ai tenu exactement compte, et espère par là m'être rapproché plus près du but, et avoir rendu superflue une correspondance qui, dans ces dernières années, m'a pris beaucoup de mon temps.

Je publie ces travaux en exprimant le vœu qu'ils puissent être utiles à la grande industrie, au service de laquelle ils ont été exécutés, et montrer en même temps qu'en Danemark on sert d'une manière sérieuse la cause du progrès.

Laboratoire de Carlsberg, Copenhague, février 1888.

[1]) Une édition complète des travaux qui suivent, et dont le Résumé français ne renferme qu'un extrait très abrégé, a été publiée en danois dans les »Meddelelser fra Carlsberg-Laboratoriet«, 1888 (Librairie de Hagerup, à Copenhague), et en allemand, dans »Zeitschrift für das ges. Brauwesen«, et dans un volume à part, chez R. Oldenbourg, à Munich, 1888, sous le titre »Untersuchungen aus der Praxis der Gährungsindustrie«.

II.

CULTURE PURE DE LA LEVÛRE AU SERVICE DE L'INDUSTRIE.

1. Sur l'introduction dans l'exploitation des brasseries de levûres cultivées à l'état de pureté et méthodiquement choisies, et sur les résultats qu'on obtient par ce procédé.

En quoi le nouveau progrès consiste.

Plusieurs de mes lecteurs se rappellent sans doute que j'ai réussi, en 1883, à introduire dans l'exploitation des brasseries des levûres cultivées à l'état de pureté et méthodiquement choisies. Les premiers essais en ont été faits dans la brasserie bien connue de Vieux Carlsberg, à Copenhague. Lorsque j'entrepris mes travaux sur cette matière, la question de la levûre était partout, dans les brasseries, une complète énigme, c'était le point le plus faible de l'exploitation. Survenait-il des difficultés, on changeait de levûre avec un autre établissement, et souvent on mélangeait aussi ensemble les levûres de plusieurs brasseries. Quelquefois on pouvait bien obtenir ainsi un bon résultat, mais souvent aussi un résultat tout aussi mauvais ou encore pire que celui qui avait donné lieu au choix d'une nouvelle levûre. Dans tous les cas, c'était un travail fait au hasard et à l'aveugle, on ne savait en somme pas du tout ce qu'on mettait dans son moût. L'analyse, telle qu'elle était alors possible, parvenait tout au plus à déterminer si une levûre était infectée ou non de moisissures et de bactéries, mais il arrivait bien souvent qu'une levûre reconnue bonne après une telle analyse donnait cependant un mauvais résultat. Je fus donc naturellement conduit à penser que le mystère gisait dans les cellules de levûre elles-mêmes, et que ces cellules en apparence identiques appartenaient peut-être à des espèces différentes. De ce point de départ sortirent successivement mes recherches sur les espèces du genre Saccharomyces, et les résultats pratiques de cette étude furent une nouvelle méthode analytique et la preuve que quelques-unes des maladies les plus communes et les plus fâcheuses de la

bière, telles que les changements désagréables de goût et le trouble de la levûre, ne sont pas dues à des bactéries, mais au contraire à certaines levûres déterminées.

Après que ces résultats eurent été pleinement confirmés, aussi bien dans l'exploitation elle-même que dans le laboratoire, par des expériences exécutées avec la plus grande rigueur, il devint évident qu'il ne suffisait pas, comme on l'avait fait jusqu'alors, de travailler avec une levûre exempte de moisissures et de bactéries, mais qu'il fallait envisager la question à un tout autre point de vue: la levûre ne devait renfermer qu'une seule espèce de Saccharomyces, à savoir l'espèce la plus favorable à la brasserie.

Dans une courte communication provisoire publiée dans »Zeitschrift für das ges. Brauwesen«, Münich 1884, p. 273, j'ai indiqué comment j'avais exécuté cette réforme et comment elle pouvait être poussée plus loin. Je n'ai pas jusqu'ici eu l'occasion de traiter ce sujet dans la Revue du laboratoire, et c'est maintenant la première fois que je donne un exposé complet de ma méthode. En quelque sorte, il est peut-être heureux qu'il paraisse si tard, quatre ans après que mes principales recherches étaient terminées. J'ai en tout cas acquis par là une plus grande expérience, et suis à même d'embrasser à la fois tous les mémoires qui, pendant ces quatre années, ont été publiés pour ou contre ma méthode. Il serait trop long de citer ici tous ces mémoires, les principaux sont dus à MM. Amthor, Aubry, Bèlohoubek, Borgmann, Chodounsky, Delbrück, Flühler, Grönlund, Hayduck, J. C. Jacobsen, Jörgensen, Lintner, P. Lindner, Marx, Morris, Thausing, Velten et Will.

La plupart de ces auteurs se sont rangés de mon côté, et les grandes attaques ont peu à peu cessé. Cependant de petites attaques et des essais pour rabaisser la valeur de mes travaux continuent encore à se produire, et souvent avec la même argumentation qui avait déjà été complètement réfutée à l'occasion d'un adversaire antérieur. J'ai appris par là que la même vérité ne saurait être trop répétée, si l'on veut qu'elle réussisse enfin à se faire jour.

Contributions de mes prédécesseurs.

Avant d'aller plus loin, il sera utile de jeter un coup d'œil en arrière sur ce qui a précédé mon travail, car, comme tout autre, il s'appuie sur les travaux de mes prédécesseurs. Dans ce cas, c'est avant tout M. Pasteur dont il doit être question.

Comme on sait, c'est cet illustre savant qui, dans son ouvrage »Etudes sur la bière«, 1876, a, pour la première fois, mis en pleine lumière le rôle considérable que les microorganismes jouent dans l'industrie de la fermentation. Il y décrit les maladies auxquelles peut être exposée la bière lorsqu'elle est attaquée par les bactéries. Comme celles-ci se distinguent facilement par leur forme des cellules de levûre, il recommande

l'emploi fréquent de l'examen microscopique dans les brasseries, et indique comment il faut s'y prendre, d'une part, pour conduire la fermentation de façon qu'elle soit à l'abri des organismes du dehors, et, de l'autre, pour préparer ce qu'il appelle, à la vérité à tort, une levûre absolument pure.

M. Pasteur pensait que, par l'emploi de ces procédés, la fabrication de la bière pourrait avoir lieu sans qu'on eût besoin de recourir aux coûteux moyens réfrigérants en usage (glace et machines à fabriquer la glace). Mais les choses se sont passées tout autrement et il devait en être ainsi, si l'on voulait maintenir les caractères principaux par lesquels la bière basse se distingue du vin. Et quant à la levûre recommandée par M. Pasteur, elle ne pouvait pas non plus jouer le rôle qu'il lui attribuait, parce que, en réalité, elle n'était pas une culture pure. La quintessence de son ouvrage ne se trouve pas dans ce domaine, mais dans sa doctrine, qui a fait époque, des bactéries et des troubles qu'elles provoquent.

Il n'indique aucune méthode déterminée pour obtenir une culture pure: on est, dans chaque cas, obligé de tâtonner et de chercher, à l'aide d'une série de cultures, à favoriser autant que possible l'organisme qu'on désire étudier, en éliminant en même temps ses concurrents. On n'arrive au plus, par cette voie, qu'a obtenir une levûre exempte de bactéries et de moisissures, et encore n'est-ce pas toujours bien certain.

M. Pasteur a peut-être voulu seulement que la levûre de l'industrie fût exempte de bactéries; M. Velten, à Marseille, l'a en tout cas ainsi compris. On ne le voit pas clairement dans son ouvrage, dont l'utilité aurait été encore bien plus grande si ce qui n'est que suppositions incertaines y était nettement distingué de ce qui constitue des doctrines bien établies.

Mais nous avons vu plus haut que quelques-unes des maladies les plus communes et les plus graves de la bière, en ce qui concerne la goût, l'odeur, la clarté et la conservation, proviennent de tout autres causes, et que c'est dans une partie des cellules de levûre elles-mêmes qu'il faut en chercher les germes. La levûre de M. Pasteur, fût-elle même exempte de bactéries, pouvait donc bien renfermer des germes de maladies, et n'offrait par suite aucune garantie. C'est là une des causes pour lesquelles son ouvrage, œuvre d'ailleurs d'un homme de génie, n'a pu prendre racine dans la pratique. Les essais qui furent faits à Carlsberg peu après sa publication n'aboutirent à rien, et le procédé de M. Pasteur ne tarda pas à être abandonné.

Dans d'anciens ouvrages de brasserie antérieurs à M. Pasteur, se trouve déjà exprimée cette opinion qu'il y a plusieurs espèces de levûre, qui produisent des fermentations différentes et peuvent donner à la bière un goût différent. Nous trouvons aussi des idées analogues chez d'anciens physiologistes, par ex. chez Bail, en 1857. On croyait généralement alors que la levûre des brasseries changeait rapidement de caractère, seulement par son transport d'une brasserie à une autre, et il y avait même beaucoup de personnes qui allaient jusqu'a supposer qu'elle pouvait se transformer en levûre de Mucor et passer par toute une série de formes de moisissures. A côté de cette interprétation, il en fut proposé une autre, notamment par Reess, en 1870, suivant laquelle les levûres n'avaient qu'une

sphère limitée de développement, et on commença à établir des espèces rien que d'après la forme des cellules; c'est ainsi que les cellules en forme de boudin furent appelées Sacch. Pastorianus, les petites cellules ovales, Sacch. ellipsoïdeus, et les grandes cellules ovales, Sacch. cerevisiæ, etc. Nous savons maintenant que cette manière de voir est aussi inexacte. Somme toute, on a fait toutes sortes d'hypothèses, mais sans rien prouver; il restait donc toujours à trouver la véritable explication.

M. Pasteur n'est guère allé plus loin dans ce domaine, car les méthodes dont il disposait ne le lui permettaient pas. Au chapitre V de son livre, il est parlé de diverses levûres alcooliques et, en plusieurs endroits, est discutée la question de savoir si elles étaient des espèces à part ou peut-être seulement des transformations de la levûre ordinaire de bière, mais elle ne reçoit aucune solution; dans quelques passages, par ex. p. 147, l'auteur semble croire que ces levûres ont des caractères specifiques déterminés, dans d'autres au contraire, par ex. p. 193, qu'elles peuvent varier à l'infini, et qu'il n'y a pas d'espèces parmi elles. Il discute de la même manière la possibilité d'une transformation de la levûre haute des brasseries en levûre basse et de celle-ci en levûre haute, et, après avoir paru conclure, p. 189, qu'une pareille transformation n'a pas lieu, il se prononce plus loin, p. 213, dans le sens contraire, et, dans la note p. 333, indique même aux brasseurs comment, suivant lui, ils doivent s'y prendre pour empêcher que leur levûre basse ne soit transformée en levûre haute, et il ne s'agit pas seulement ici d'une transformation provisoire. Toutes les possibilités sont ainsi discutées tour à tour, mais cette discussion n'aboutit pas à une détermination bien précise. Ce résultat négatif s'explique surtout par cette circonstance, que le développement de la science *à cette époque* ne permettait guère d'aller au-delà, et aussi en partie par le fait que M. Pasteur n'a pas voulu soumettre le problème à une étude botanique. Il n'est fait dans son ouvrage aucun essai pour distinguer les Saccharomyces des autres levûres, toutes les cellules de levûre bourgeonnantes et douées à un degré assez bien marqué de la faculté de produire la fermentation alcoolique, sont rangées dans la même catégorie et désignées tantôt comme des Saccharomyces, tantôt comme des levûres, des ferments alcooliques, etc.; et ainsi des organismes qui appartiennent à des divisions entièrement différentes dans notre système actuel se trouvent mêlés. Dans ces circonstances, il ne pouvait naturellement pas être question d'entreprendre une analyse ou un choix méthodique des espèces.

La critique que pourrait renfermer le compte rendu qui précède ne s'adresse pas à l'ouvrage si justement célèbre de M. Pasteur, mais à ceux de ses disciples qui persistent à s'en tenir à des points de vue vagues, et y recherchent avec une sorte de prédilection les passages obscurs pour y lire ce qui ne s'y trouve pas et ce qui, étant donnée l'époque où l'ouvrage a paru, ne pouvait pas s'y trouver.

Dans un autre ordre d'idées que M. Pasteur, j'ai, dès l'origine, cherché à découvrir des caractères botaniques, chez toutes ces cellules de levûre en apparence identiques. Et je n'ai pas tardé à constater que *la solution de la question des levûres était identique à la question des espèces du genre Saccharomyces.* Si mes études ont marché si lentement c'est parce que les méthodes que j'ai trouvées

dans la littérature ne pouvaient, pour la plupart pas me servir, et que j'ai d'abord dû en créer de nouvelles. Pour ce qui regarde les cultures pures, je suis toujours parti du principe que seulement l'ensemencement d'une seule cellule donne une sûreté absolue, et je l'ai même maintenu en me servant de la gélatine nourricière, contrairement à M. Koch et à son école.

C'est en partant ainsi, dans mes recherches, de points de vue autres que ceux de M. Pasteur, que j'ai réussi à obtenir des résultats pratiques et théoriques auxquels on ne pouvait arriver par la voie qu'il avait indiquée. Mais que ses »Études sur la bière« aient été pour moi un travail préliminaire très précieux sur lequel je me suis bien souvent appuyé, c'est ce que je me plairai toujours à reconnaître; c'était pour son temps l'ouvrage le plus parfait qu'on possédât, et il a été d'une bien grande utilité. Puissent un jour ma doctrine et mes méthodes, quand, par suite des progrès de la science, elles seront remplacées par d'autres plus complètes, mériter aussi un semblable éloge.

Les résultats pratiques obtenus.

Lorsque, en 1883, je m'adressai au propriétaire de Vieux Carlsberg, feu M. J. C. Jacobsen, pour lui demander l'autorisation de faire mes essais en grand dans la brasserie, il n'avait pas grande confiance dans mes plans. Une des principales objections qu'il me fit, c'était qu'une culture pure de la levûre basse de la brasserie ne pourrait pas donner une seconde fermentation convenable, pour laquelle le concours des levûres sauvages que je voulais exclure était, croyait-il, précisément nécessaire.

Mais peu de temps auparavant, quelques-unes de mes recherches avaient donné dans la pratique un résultat frappant qui parlait à un haut degré en faveur de l'exactitude de ma doctrine sur les Saccharomyces. Dans un mémoire sur les maladies de la bière (voir le présente Revue 1883, p. 52), j'avais expliqué la maladie qui, pendant deux ans, avait causé tant de dommage dans la brasserie de Tuborg, près Copenhague, à savoir le trouble de la levûre, et cette brasserie ayant promptement été remise en ordre après avoir suivi mes prescriptions, ce résultat était bien une preuve manifeste de la valeur pratique de mes découvertes. A peu près à la même époque, et comme M. Jacobsen lui-même le fit savoir dans une conférence tenue dans la Société technique, il survint une difficulté dans sa brasserie, la bière ayant commencé de prendre un goût amer désagréable et une mauvaise odeur. Suivant les idées du temps, il en chercha naturellement la cause dans une infection de bactéries, et, comme on n'en trouva pas, dans un défaut du moût, notamment dans le houblon. Mais on ne put non plus rien découvrir. Dans un mémoire de 1882, j'avais par occasion publié une petite recherche sur un Saccharomyces qui produisait une bière analogue à celle dont on se plaignait à Carlsberg. J'y exprimais en même temps l'opinion que les

levûres sauvages pouvaient apporter dans l'industrie de la fermentation d'aussi grands troubles que les bactéries. Qu'on ne prêtât pas alors grande attention à ma doctrine est assez naturel, car elle n'était pas encore suffisamment établie. Mais, en 1883, j'avais fait un pas en avant et mon succès à Tuborg eut aussi pour résultat que j'obtins l'autorisation désirée. Ma méthode fut donc essayée en grand dans la brasserie, et le résultat de cette épreuve confirma pleinement mon attente.

De la levûre impure, je séparai quatre espèces différentes de Saccharomyces et, en expérimentant tantôt avec chacune d'elles à part, tantôt en les mélangeant, je reconnus qu'il n'y en avait qu'une seule qui donnât une bière normale avec un bon goût et une bonne odeur, comme on la désirait. C'est cette espèce qui maintenant est généralement connue dans le monde des brasseries sous le nom de levûre basse n° 1 de Carlsberg. Parmi les autres, je retrouvai l'espèce que j'avais examinée en 1882, et dont, dans un de mes mémoires de 1883, j'avais donné une description détaillée; je l'ai désignée sous le nom provisoire de Sacch. Pastorianus I. C'etait seulement elle qui produisait la maladie. La bière préparée avec la levûre basse n° 1 seule était toujours excellente, tandis qu'une addition de Sacch. Pastorianus I lui donnait le goût amer redouté et une odeur désagréable. Ce résultat eut une grande importance, car M. Jacobsen reconnut alors que c'était là réellement une réforme, et cette réforme, il l'introduisit aussitôt dans toute sa grande brasserie. Au commencement, il alla même plus vite que je ne le désirais. Ainsi se termina, en ce qui concerne Vieux Carlsberg, la lutte que j'eus à soutenir pour cette affaire. Cela se passait en 1884.

J'ai communiqué ces renseignements sur les deux brasseries ci-dessus nommées, en partie pour montrer la marche que l'application de la nouvelle méthode a suivie, en partie parce qu'ils fournissent le meilleur argument en faveur d'une réforme que je désire voir se propager autant que possible.

Les résultats obtenus ont donc prouvé que les doutes de M. Jacobsen relativement à la seconde fermentation n'étaient pas fondés. Néanmoins les mêmes doutes ont été plus tard exprimés de différents côtés. Pour le moment, j'ai seulement rencontré cette objection chez des physiologistes anglais; il semble ainsi que la fabrication de la bière haute anglaise, riche en alcool, pourrait apporter des difficultés spéciales dans l'emploi de cultures pures. Dans des brasseries danoises à fermentation haute, où l'on fabrique des bières moins alcooliques sans seconde fermentation proprement dite, M. A. Jorgensen a, depuis 1884, avec succés, appliqué la méthode avec quelques modifications; d'après ce qu'il m'a communiqué verbalement, tel est aussi le cas dans quelques brasseries de l'étranger, qui en principe travaillent de la même manière que les brasseries anglaises.

C'est grâce surtout à M. Jacobsen que mes essais pratiques ont, dans très peu de temps, été connus tant en Danemark qu'à l'étranger; cependant ils ont en général été considérés avec méfiance, même par des brasseurs intelligents. Cette résistance aurait pu, pendant plusieurs années, empêcher la méthode de se propager si M. Aubry n'avait, dès l'origine, travaillé en sa faveur avec autant d'énergie que d'habileté. C'est à lui que revient l'honneur d'avoir frayé la voie à cette réforme en Alle-

magne. En Bohème, c'est plus tard M. Belohoubek qui a fait les premiers pas. en Norvège, M. Heiberg. En Danemark, j'ai été secondé par MM. A. Jørgensen et Grønlund. Le laboratoire de M. Jørgensen a surtout déployé une activité considérable. C'est de là qu'ont été approvisionnées de levûre pure non seulement beaucoup de brasseries scandinaves, mais aussi un grand nombre d'autres à l'étranger. En France, c'est M. Louis Marx qui a pris l'affaire en main et, sans son intervention, cette réforme n'y aurait encore reçu aucune application. Dans les dernières années, j'ai eu plusieurs aides habiles parmi les chimistes et botanistes étrangers qui ont travaillé au laboratoire sous ma direction.

Si nous jetons un coup d'œil sur les progrès que la réforme a faits jusqu'à présent, nous trouvons qu'elle s'est introduite dans tous les pays où l'on fabrique de la bière, ce qui cependant ne veut pas dire qu'elle soit encore universellement appliquée ni universellement reconnue; s'il en était ainsi, le présent mémoire serait superfin au moins en partie.

En Danemark et en Norvège, toutes les grandes brasseries ont adopté ma méthode. En Suède, on a commencé a l'employer, et tel est aussi le cas pour la Finlande, pour la Bohême et les autres pays autrichiens, pour la Suisse, le nord de l'Italie, la France, la Belgique et l'Amérique du Nord. Outre le Danemark et la Norvège, elle a été introduite et est devenue d'un emploi constant dans l'exploitation d'un grand nombre de brasseries de premier rang en Russie, en Hollande et en Allemagne, principalement en Bavière.

De Vieux Carlsberg il a aussi été envoyé de la levûre pure à des brasseries en Asie, et du laboratoire de M. Jørgensen, tant en Asie qu'en Australie et dans l'Amérique du Sud. Quel a été le résultat de ces essais dans ces contrés éloignées, je l'ignore encore.

Il résulte déjà clairement de ce qui précède que mon système apporte avec lui des avantages pratiques considérables. Ces avantages peuvent se résumer comme il suit:

On s'assure un résultat certain et une exploitation rationnelle là où auparavant tout était plus ou moins basé sur le hasard.

On est garanti contre les maladies de la bière, maladies qui peuvent occasionner de grandes pertes d'argent.

On obtient une levûre qui, dans le commerce, a une valeur plus grande que la levûre impure ordinaire.

Enfin on contribue pas là à relever l'industrie, ce qui, en tout cas, pour le praticien intelligent, doit avoir un grand intérêt.

Un autre avantage de ces améliorations, c'est qu'elles n'entrainent pas de dépenses spéciales, et peuvent par suite être aussi introduites dans les petites brasseries.

Il était à prévoir que, dans beaucoup d'endroits, mon travail serait mal compris et mal employé. C'est aussi ce qui est arrivé. J'ai noté avec soin tous les cas de ce genre qui sont parvenus à ma connaissance, et on en trouvera un exposé dans les deux éditions complètes de mon ouvrage mentionnées dans la note de la page 169.

On pourrait me demander si, en employant des mélanges d'une composition bien connue à l'avance, il ne serait pas possible d'influer sur le goût de la bière et d'obtenir ainsi des variations qui fussent bien accueillies du public. Que cela puisse aussi se faire d'une manière rationnelle,

c'est évident. Il suffit d'ajouter, par ex., à la levûre de brasserie une levûre sauvage qui, de même que mon Sacch. Pastorianus II, n'occasionne pas de maladie. Dans quelques cas, on fera ce mélange tout de suite, dans d'autres au contraire seulement à la fin de la fermentation principale. On peut également préparer des mélanges garantis de diverses levûres basses de brasserie. Mais recommander ces mélanges, fussent-ils complètement garantis par des analyses exactes, je ne le puis pas. L'idéal dans toute fabrication est de travailler aussi simplement et aussi sûrement que possible, et il est évident qu'on se rend plus facilement maître d'un seul facteur que de plusieurs, même s'ils sont tous parfaitement connus.

Lors de l'exposition française des bières à Paris, en 1887, M. Velten a fait sur la culture des levûres de brasserie quelques conférences, qui ont été publiées dernièrement dans la Revue universelle de la Brasserie et Malterie, nº 742 et 743.

Après avoir indiqué la différence essentielle qu'il y a entre la méthode de M. Pasteur et la mienne, il les décrit l'une et l'autre et arrive à ce résultat que la première est absolument à préférer. En cultivant, d'après M. Pasteur, une levûre ordinaire de brasserie dans une dissolution de sucre contenant de l'acide tartrique, ou dans du moût de bière additionné d'acide phénique et d'alcool, on se débarasse des bactéries et obtient, du moins dans beaucoup de cas, une levûre qui se compose de plusieurs espèces, partie de levûres de brasserie partie de levûres sauvages. On n'a pas besoin de s'inquiéter des quantités relatives de ces levûres, tout aussi peu que de savoir à quelles espèces elles appartiennent; il suffit que les bactéries aient disparu. Ma doctrine que certaines espèces de Saccharomyces produisent des maladies dans la bière est non avenue pour M. Velten; il relève contre moi qu'il est nécessaire que la levûre des brasseries se compose de plusieurs espèces, si l'on veut que la bière ait de l'arome et du bouquet, et en conclut que je me suis trompé en n'en prenant qu'une seule espèce. Il annonce enfin qu'en Allemagne, notamment à Berlin, on a trouvé que mes essais de réforme reposent sur une erreur, et que j'ai fini moi-même par le reconnaître et suis revenu à l'ancien procédé de M. Pasteur.

Ceux qui ont suivi l'exposé qui précède auront vu que M. Velten est complètement dans l'erreur. La levûre de brasserie que je prépare n'est toujours, comme à l'origine, composée que d'une seule espèce choisie, et, au lieu de perdre des partisans, mon système en gagne au contraire continuellement de nouveaux. J'ai encore récemment eu la satisfaction d'apprendre qu'il a été introduit dans deux des plus grandes brasseries de Berlin, et reconnu par mes anciens adversaires à l'Institut royale agricole de cette ville.

Chose singulière, M. Velten semble ignorer que M. Pasteur lui-même a déclaré que la voie indiquée par moi est la bonne (Bulletin de la Société d'encouragement pour l'industrie nationale. Paris janvier 1887, p. 45).

Depuis 1884, il a en outre été fait une amélioration qui a bien son importance dans la pratique. Je veux parler de l'appareil que M. le capitaine Kühle, le directeur de la brasserie de Vieux Carlsberg, et moi, nous avons construit pour faire les cultures pures, et qui permet de four-

nir à l'exploitation, à de courts intervalles, de grandes masses de levûre pure. Il en est donné une description dans le chapitre suivant.

Une autre amélioration qui se rattache étroitement à l'emploi de mes levûres pures, a été introduite, en 1885, à Vieux Carlsberg par feu M. J. C. Jacobsen. Il s'agit en effet d'un appareil dans lequel le moût bouillant, venant de la brasserie, peut être refroidi et aéré sans entrer en contact avec les microorganismes de l'air. C'est une modification de l'appareil de M. Velten; M. le capitaine Kühle y a apporté plus tard de nouvelles améliorations. L'appareil de M. Velten, construit à Marseille plusieurs années auparavant, n'a pas eu jusqu'a présent une véritable importance pratique, car il y manquait la chose essentielle. A quoi bon en effet avoir un moût stérilisé si la levûre qu'on y mettait était infectée de germes de maladie! C'est seulement après la solution de la question des levûres qu'il y avait lieu de résoudre celle de la suppression des bacs rafraîchisseurs, et c'est aussi seulement alors que M. J. C. Jacobsen a introduit l'usage des appareils ci-dessus mentionnées. M. C. Jacobsen a dernièrement établi à Nouveau-Carlsberg un appareil basé sur le même principe que le précédent, mais qui en diffère sous plusieurs rapports. Le moment est maintenant venu où cette amélioration sera sans nul doute introduite successivement dans un grand nombre de brasseries où la levûre pure a fait ses preuves, et servira ainsi à compléter le nouveau système.

Dans ce qui précède, il a toujours été question des brasseries à fermentation basse; jusqu'ici en effet mes travaux pratiques n'ont eu que ce domaine pour objet; mais il est vraisemblable qu'ils pourront aussi, avec des modifications convenables, être appliqués dans les autres branches de l'industrie des fermentations, et, en ce qui concerne les brasseries danoises à fermentation haute, le problème, comme nous l'avons dit plus haut, a déjà été résolu par M. A. Jørgensen.

2. Fabrication en grand de la levûre pure.

Travaux préliminaires.

Nous avons naturellement pris notre point de départ dans la brasserie elle-même. Y trouve-t-on une levûre qui se comporte d'une manière satisfaisante tant dans la fermentation principale que dans la seconde fermentation, et qui, chose essentielle, donne un produit ayant les qualités que demande le brasseur, on désire naturellement la conserver. Dans beaucoup de cas, et peut-être dans la plupart, la masse principale d'une pareille levûre se composera d'une levûre de brasserie, et ne sera mélangée d'autres microorganismes que dans une proportion tout à fait secondaire. Dans ces circonstances, le résultat est dû surtout à cette levûre de brasserie; elle donnera à elle seule le produit désiré.

Dès l'origine de mes études pratiques sur les levûres basses de brasserie et les levûres sauvages, j'observai que lorsqu'elles étaient mélangées ensemble dans la levûre ajoutée au moût, les cellules de ces dernières, dans la biére de la surface, étaient par rapport à celles des levûres de brasserie, moins nombreuses au commencement de la fermentation principale qu'a la fin de celle-ci. C'est en partant de cette observation que, dans mes cours et mes exercices, j'ai toujours indiqué que les échantillons pour l'analyse des levûres sauvages devaient de préference être pris à la fin de la fermentation principale, et les échantillons pour faire des cultures pures de la levûre des brasseries, au commencement de la fermentation principale, dans les deux cas de la bière de la surface dans les caves de fermentation. Ce renseignement n'a pas eu une petite importance pratique.

J'ai déjà décrit des méthodes pour faire des cultures pures (voir dans la présente Revue mes mémoires de 1882 et de 1883, mais surtout celui de 1886, p. 92 et le mémoire suivant «Observations faites sur les levûres de bière»)[1].

La suite de ce résumé ne donne qu'un court aperçu du contenu de l'édition complète, publiée, comme il a été dit p. 169, en danois et en allemand, et à laquelle je me réfère pour plus amples renseignements.

Après avoir examiné le cas où l'on a affaire, dans les brasseries, non pas à une seule espèce, mais à plusieurs qui se partagent la domination, et qui par suite décident conjointement du résultat, j'indique quelle est la meilleure manière de conserver la culture pure obtenue, de façon qu'elle présente en tout temps une végétation active et pure. Dans ce but, on emploie une dissolution stérilisée de saccharose à 10 %. Je

[1] Les ballons et les appareils dont on se sert à mon laboratoire se trouvent chez Dr. Rohrbeck, Karlstrasse 24 à Berlin.

Mon fournisseur d'instruments, M. Jacob, à Copenhague, ne se charge pas des envois à l'étranger.

rappelle en même temps que les enveloppes en papier à filtrer, décrites par moi auparavant, sont le moyen le plus commode pour les envois de petits échantillons de levûre.

Mon ancien procédé.

Pour préparer la grande quantité de levûre que demande la brasserie, je me servais de 4—5 ballons Pasteur à deux tubulures de $1^1/_4$ litre et de 4 vases en métal, sur le modèle de la Fig. 1, ayant chacun une capacité de 10 litres.

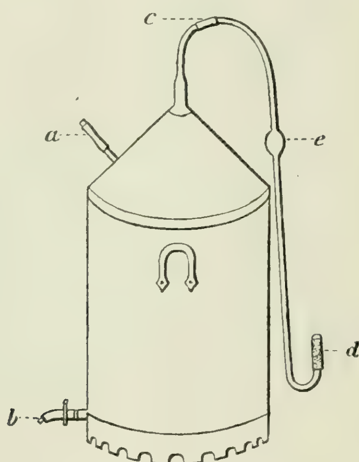


Fig. 1.

Je décris ensuite comment la stérilisation doit être pratiquée pour offrir toute la sûreté voulue. Comme liquide nourricier, on se sert du moût houblonné ordinaire tel qu'on le prépare dans les brasseries pour la bière de garde. Avec les 4 vases en métal on produit de la levûre pour 1 hectolitre de moût.

Appareil pour la culture pure.

Dans l'édition complète danoise et allemande, j'ai fait observer que quelques espèces de levûres résistent moins bien que d'autres à leurs concurrents, et j'ai cité comme exemple la levûre basse n° 2 de Carlsberg. Lorsqu'on travaille avec des espèces de ce genre, il y a du danger, et un danger relativement grand, que les germes de maladie puissent prendre

le dessus. Dans ces circonstances, il importe donc beaucoup qu'on fasse passer dans les caves de fermentation, à des intervalles aussi courts que possible, de grandes quantités de levûre absolument pure, pour prendre la place de la vieille levûre infectée. Avec mon ancien procédé indiqué ci-dessus, c'était déjà un assez grand travail de fournir deux fois par mois à la brasserie de la levûre pour 1 hectolitre de moût, et comme cette quantité ne donne pas une sûreté complète pour toutes les espèces, le désir me vint tout naturellement de faire encore un pas en avant. A cette occasion, je m'adressai à M. le capitaine Kühle, directeur de la brasserie de Vieux Carlsberg, et, en 1885, nous avons commencé à travailler ensemble à établir, dans la cave de fermentation même, un appareil pour une production en masse et continue de levûre absolument pure. Après quelques essais, ce résultat a aussi été obtenu, et l'honneur en revient principalement à M. le capitaine Kühle.

L'appareil (voir Fig. 2 et 3) se compose de trois parties et des tubes qui les relient les unes aux autres: I, la pompe à air (*A*) avec le réservoir à air (*B*): II, le cylindre à fermentation (*C*) et III, le cylindre pour le moût (*D*).

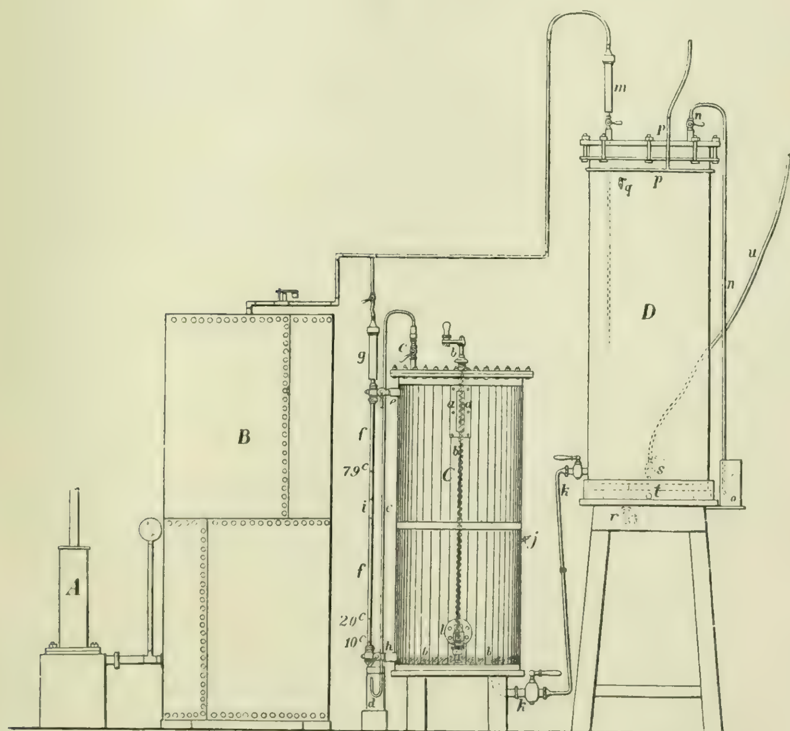


Fig. 2.

La pompe à air (A) est actionnée par une machine et envoie dans le réservoir B de l'air comprimé à 1—4 atmosphères. On stérilise le cylindre D à l'aide de la vapeur surchauffée fournie par une des chaudières de la brasserie, et le remplit ensuite d'air stérilisé, qui y arrive avec la pression du réservoir après avoir traversé un filtre à coton (***m***) où il est complètement purifié. Le moût bouillant est amené en s dans le cylindre par la conduite principale (u) de la brasserie. Le refroidissement se fait par des filets d'eau froide qui, de l'anneau rafraîchisseur (p), coulent sur les parois du cylindre. L'air nécessaire à l'aération du moût passe à travers le filtre (***m***).

Le cylindre C est stérilisé de la même manière que le précédent. Il est muni d'un filtre analogue (g), d'un tube en verre (f) pour observer la hauteur du liquide, d'un tube de dégagement (c) pour l'acide carbonique, d'un agitateur (b) pour mélanger la levûre avec le moût et d'un petit tube (j) pour introduire la levûre et en prendre des échantillons.

Comme le montre la Fig. 2, le cylindre C, lorsqu'il est placé dans la cave de fermentation, est recouvert de bandes de bois; dans la Fig. 3, au contraire, les deux cylindres sont entourés d'une enveloppe, ce qui permet d'en régler la tempétature intérieure. Les lettres, dans cette dernière figure, ont la même signification que dans la Fig. 2.

En regardant avec attention l'appareil, ont voit qu'il est construit d'après les mêmes principes que les ballons qui sont employés dans les laboratoires pour les expériences avec les microorganismes, et que les ballons à deux cols de M. Pasteur ont surtout servi de modèle.

Lorsqu'on a ajouté une fois de la levûre, l'appareil peut travailler pendant une année ou plus longtemps si l'on veut. Un cylindre à fermentation donne en général tous les 10 jours de la levûre absolument pure pour 8 hectolitres de moût. Il en reste alors assez dans le cylindre pour faire fermenter 170 litres de moût; désire-t-on aller plus vite, on peut aussi enlever la levûre quatre fois par mois au lieu de trois, et établir deux ou plusieurs cylindres à fermentation.

Dans l'emploi de l'appareil, il y a deux points principaux à observer: 1) que la vapeur envoyée dans les cylindres soit en quantité suffisante pour produire une véritable stérilisation, et 2) que, pendant le refroidissement et le soutirage, il y ait toujours un exés de pression d'air stérilisé dans le cylindre avec lequel on opère. Si ces deux conditions sont remplies, aucune infection, aucune aspiration d'aïr impur ne peut avoir lieu.

Les deux éditions complètes mentionnées plus haut renferment une description détaillée de l'appareil et de son emploi.[1])

[1]) Il n'a été pris de brevet pour cet appareil, et chacun est par conséquent libre de le construire. Cependant nous recommandons M. le capitaine Kühle et moi, à ceux qui désirent l'employer de prendre les deux cylindres chez M. W. E. Jensen, chaudronnier à Copenhague, comme cet établissement en connaît parfaitement toute la construction et livre un bon travail.

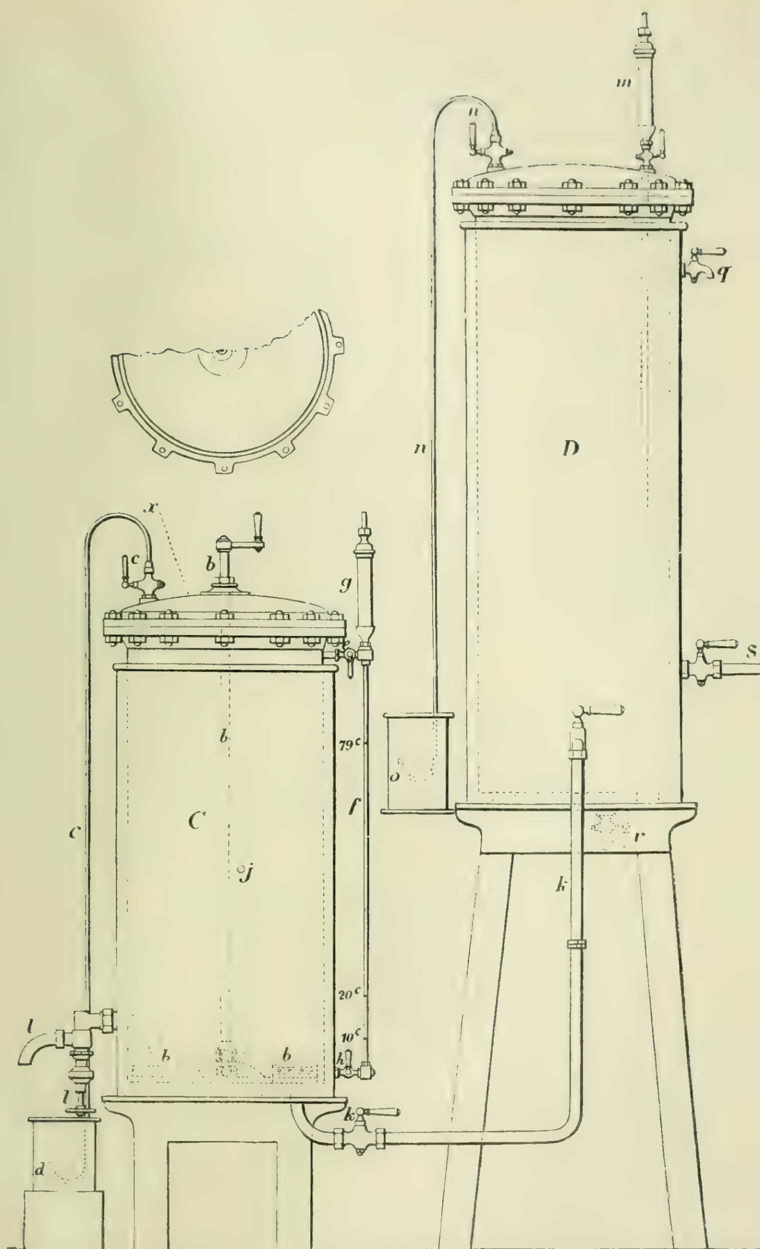


Fig. 3.

Sur les filtres.

Je communique une série de recherches comparatives sur les filtres à coton et sur les filtres Chamberland, qui se composent de tuyaux d'argile. Pour purifier l'air, les premiers sont à préférer, mais il va sans dire qu'ils ne peuvent donner des liquides stérilisés; pour cet usage, les filtres Chamberland sont les meilleurs que je connaisse.

Préparation de la levûre pour l'appareil et son expédition.

Cette levûre se prépare dans les 4 vases en métal mentionnés plus haut (mon ancien procédé). Je rappelle ici que le laboratoire de Carlsberg, étant un laboratoire de recherches scientifiques, ne peut se charger de travaux pour les brasseries. Ce n'est d'ailleurs pas nécessaire, comme il y a un grand nombre de laboratoires publics qui ont adopté mes méthodes dans leur programme. Ce sont: le laboratoire de M. Jørgensen, Vesterbrogade, à Copenhague, les stations d'essais pour les brasseries à Berlin, Nuremberg, Munich, Vienne et Prague, le laboratoire de M. Kokosinski à Lille, celui de MM. Wahl et Henius à Chicago; on peut enfin

Le prix du cuivre ayant haussé de c. 90 %, M. Jensen s'est vu forcé, en janvier 1888, d'augmenter ses prix.

Cylindre pour le moût avec enveloppe et anneau rafraichisseur, complètement monté (Fig. 3, *D*)	700 Kr.
Cylindre pour le moût comme le précédent, mais seulement avec une simple cuvette au lieu d'une enveloppe	500 Kr.
Cylindre à fermentation avec enveloppe, complètement monté (Fig. 3, *C*)	750 Kr.
Cylindre à fermentation comme le précédent, mais sans enveloppe	550 Kr.

Ces cylindres sont dans tous les cas munis d'un couvercle de la construction indiquée Fig. 3, et sont en cuivre étamé avec des parties nickelées.

Les cylindres fabriqués par M. Jensen se trouvent également dans l'établissement de M. F. W. Pest, Bergstr. 8 à Berlin.

La pompe à air et le réservoir à air peuvent être achetés partout. Une bonne pompe à air coûte c. 400 Kr., et un réservoir à air d'une contenance de 25 pieds cubes et essayé à 5 atmosphères coute c. 500 Kr.

Les personnes qui désirent se renseigner sur l'appareil sont priées de s'adresser directement au fabricant qu'elles auront choisi.

y ajouter le laboratoire de M. Marx, à Marseille, d'où plusieurs brasseurs français, bien que ce ne soit pas public, ont reçu des cultures pures. Peut-être y en a-t-il d'autres que je ne connais pas; si je ne les nomme point, qu'on n'interprète donc pas mon silence comme un manque d'égards. Je me permets de renvoyer à ces laboratoires les établissements qui désirent demander des conseils pour l'application de mes méthodes. Je profite en même temps de l'occasion pour ajouter que je ne puis qu'exceptionnellement recevoir des élèves, et seulement en petit nombre, et que ceux-là seuls peuvent être admis qui ont déjà reçu une instruction scientifique préparatoire (physiologistes, botanistes, chimistes). Des cours populaires pour les brasseurs se font au laboratoire de M. Jørgensen.

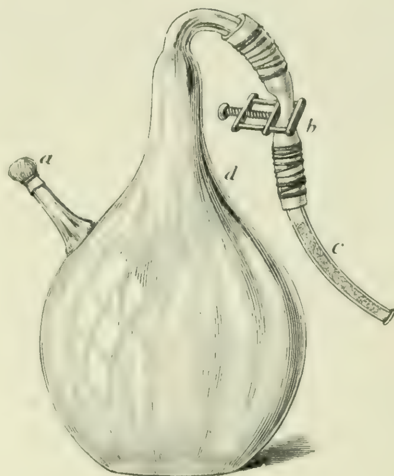


Fig. 4.

On peut comme auparavant se procurer les deux levûres basses n° 1 et 2 employées á Carlsberg en s'adressant directement à M. le capitaine Kühle.

Le brasseur doit lui-même surveiller l'appareil et, s'il n'y a pas de laboratoire de zymotechnie dans le voisinage, il doit aussi, le plus souvent, introduire lui-même la levûre dans le cylindre à fermentation. Il sera souvent forcé de faire venir sa levûre de loin; j'ai fait faire pour cet usage le ballon représenté Fig. 4.

Liste des brasseries où l'appareil pour la culture pure est employé.

Lorsque l'appareil, au commencement de 1887, dut être installé à Nouveau-Carlsberg, il devint nécessaire, à cause des localités, d'y apporter quelques changements, qui furent exécutés d'une manière aussi ingénieuse que pratique par M. l'inspecteur en chef Henningsen. Une autre modification est due à M. le Dr Elion, directeur du laboratoire de la brasserie Heineken, à Rotterdam. Elle consiste principalement dans l'introduction d'un stérilisateur. Dans la description donnée plus haut, le moût bouillant et par conséquent stérilisé était pris de la conduite principale de la brasserie avant son arrivée aux bacs rafraîchisseurs. C'est en effet le moyen le plus pratique pour approvisionner le cylindre à moût de moût stérilisé. On choisira donc de préférence ce procédé,

même dans les brasseries où il faudra donner à la conduite de moût une assez grande longueur: c'est ce qu'on a fait par exemple, à Tuborg, près Copenhague. En général, il n'y a guère beaucoup de cas où l'on ne puisse s'arranger de cette façon.

Mais si les localités ne le permettent pas, il faut, après l'introduction du moût dans le cylindre, le stériliser en le faisant bouillir, et puis le faire refroidir et l'aérer, comme il a été dit plus haut; le travail devient par là plus difficile et prend plus de temps, mais il n'est pas impraticable. C'est pour le faciliter que M. le Dr Elion a entouré son cylindre à moût d'une enveloppe de vapeur. M. W. E. Jensen, à Copenhague, emploie au contraire un serpentin qui est placé dans le cylindre.[1])

Assez différent des appareils précédents est celui que M. Louis Marx a construit. Mais il n'est calculé que pour fournir de la levûre à 1 hectolitre de moût à la fois. Dans son laboratoire à Marseille, M. Marx a trois de ces appareils pour faire des cultures pures qu'il envoie à différentes brasseries françaises, et ils ont très bien fonctionné.

L'appareil construit par M. le capitaine Kühle et par moi est maintenant employé dans les brasseries suivantes:

En Danemark:

1) Vieux Carlsberg, 2) Nouveau Carlsberg et 3) Tuborg, près Copenhague, 4) Ceres à Aarhus et 5) Albani à Odense.

En Norvège:

Ringnes, à Christiania.

En Suède:

Bjurholm, à Stockholm.

En Finlande:

Sörnäs, à Helsingfors.

En Russie:

1) Trochgorny et 2) Karneff et Gorschanoff, à Moscou, et 3) Kalinkin, à St. Pétersbourg.

En Hollande:

Baartz et Zoon, à Rotterdam.

En Allemagne:

Viktorja, à Berlin.

Dans l'Amérique du Nord:

Philipp Best, Brewing Co. à Milwaukee.

Chez MM. Baartz et Zoon, on emploie la fermentation haute, toutes les autres brasseries sont à fermentation basse. La modification de M. le Dr Elion est adoptée dans la brasserie Heineken, à Rotterdam et dans la Böhmischen Brauhause, à Berlin. A Vieux Carlsberg, on emploie

---

[1]) Ces serpentins coûtent 50 Kr.

3 cylindres à fermentation, à Nouveau Carlsberg, à Kalinkin, à Viktoria et à Milwaukee, 2, et dans les autres brasseries, 1.

Comme il a été dit plus haut, les brasseries ci-dessus nommées ne constituent qu'une petite partie de celles qui travaillent maintenant d'après mon système. La chose principale est et demeure la culture absolument pure de la levûre méthodiquement choisie; et c'est seulement par cette culture pure que, l'appareil acquiert son importance. On obtient de bons résultats avec mon ancien procédé, mais pas du tout avec l'appareil quand on emploie une levûre ordinaire au lieu d'une levûre pure.

III.

OBSERVATIONS FAITES SUR LES LEVÛRES DE BIÈRE.

Les travaux qui précèdent reposent sur l'idée que les Saccharomyces sont des espèces déterminées, et que les caractères établis par moi sont constants. Si ces organismes, comme quelques savants sont encore portés à le croire, pouvaient facilement se fondre les uns dans les autres, et qu'il n'y eût entre eux plus de limites, mes recherches perdraient la plus grande partie de leur valeur au point de vue pratique.

Qu'une recherche systématique sur les levûres doive commencer par les endospores et qu'elle doive être expérimentale, c'est dans la nature des choses. Tel aussi a été le point de départ de mes études dans ce domaine. Elles nous ont non seulement appris qu'il y a plusieurs espèces de Saccharomyces, mais aussi donné en même temps pour chacune d'elles, et pour la première fois, des caractères bien précis. Nous avons en effet constaté que les courbes des températures pour le développement des spores ont bien en général la même forme, mais que les points principaux, ceux qui dépendent des températures maxima et minima, donnent des caractères distinctifs. A d'autres points de vue, nous avons aussi appris qu'il y a des différences dans la manière dont les espèces réagissent contre les températures: dans l'eau distillée, la mort, par exemple, survient pour les diverses espèces, toutes choses égales d'ailleurs, à des températures différentes, et on observe de même des différences relativement au bourgeonnement, au pouvoir fermentatif, à la production des voiles, etc.

Lorsqu'on les cultive dans les mêmes conditions, la forme des cellules peut fournir des caractères pour des groupes et quelquefois aussi pour des espèces: tel est le cas aussi bien pour la levûre de fond que pour les végétations des voiles, et non seulement quand la culture se fait dans des liquides, mais aussi quand elle a lieu sur un substratum

nourricier solide. Presque toutes les espèces du genre Saccharomyces peuvent bien apparaître avec les mêmes formes, et la plupart du moins, sinon toutes, peuvent bien. dans leur évolution, devenir chacune tour à tour toutes les espèces établiés par M. Reess, mais les mêmes conditions. Le caractère ne gît donc pas dans la forme seule, comme on le supposait auparavant, mais en même temps dans les conditions extérieures qui l'ont produite. Ces organismes présentent également des différences dans leur action sur les sucres, notamment sur la maltose, comme en général dans les réactions chimiques qu'ils provoquent dans les liquides nourriciers. Quelques-uns peuvent être employés dans l'industrie et d'autres non, et il y en a certains qui provoquent des maladies dans la bière. J'ai également observé des différences, mais seulement graduelles, dans la manière dont ils se comportent vis-à-vis de plusieurs méthodes de coloration.[1]) De plus grande importance, au moins pour l'analyse pratique, semble être la différence qui. dans certaines conditions de culture, se manifeste dans la structure des spores des levûres basses industrielles et des levûres sauvages.

Il va sans dire qu'on ne peut pas, dans tous les cas, distinguer entre les espèces à l'aide d'un seul des caractères indiqués plus haut, il faut souvent en employer plusieurs. Les plus importants sont ceux que présente la marche du développement des spores; au point de vue pratique, parce qu'ils permettent, sans culture pure préalable, d'entreprendre directement l'analyse d'une levûre basse de brasserie, lorsqu'il s'agit de savoir si elle renferme ou non des levûres de maladie (voir cette Revue 1886 p. 88 et 1888 p. 137)

Il est relativement facile de produire en sens divers des variations temporaires, souvent profondes, mais une culture convenable les fait disparaître, et l'espèce sur laquelle on a opéré reprend son état primitif; jusqu'à présent, je n'ai pas réussi à produire des espèces nouvelles. Un résultat qui a pour nous un intérêt pratique, c'est que les espèces, du-

---

[1]) Les recherches indiquées ci-dessus ont été publiées dans le Compterendu des travaux du laboratoire de Carlsberg, 1882, 1883, 1886 et 1888. Une traduction des Résumés français a paru dans les années correspondantes de Zeitschr. für das ges. Brauwesen, Münich. Dans une conférence tenue à Graz le 12 juin 1887, j'ai fait une courte communication sur les caractères des cellules de levûre cultivées dans un substratum nourricier solide, et sur la différence ci-dessus mentionnée dans la structure des spores (voir Bulletin de la Société d'encouragement pour l'Industrie nationale. Paris 1887, p. 494, et Centralbl. für Bacteriologie und Parasitenkunde 1887, II B., p. 118).

Les noms de »levûre industrielle«, de »levûre de bière«, d'»espèce de culture« etc. ne signifient pas que ces espèces aient pris naissance sous l'action d'une culture, car nous ne savons encore rien à ce sujet, mais seulement qu'elles sont employées au service de l'industrie. Tous les autres Saccharomyces sont par opposition appelés des »levûres sauvages«. Dans l'état actuel de la science, nous devons admettre que non seulement les levûres sauvages mais aussi les levûres industrielles se trouvent dans la nature.

rant une culture dans le moût de bière poursuivie sans interruption pendant plusieurs années, n'ont éprouvé que de petites oscillations. Nous mentionnerons ici plus en détail les deux séries suivantes de recherches, qui ont un intérêt tout spécial pour la brasserie.

La première traite des particularités individuelles que peuvent présenter les levûres basses des brasseries; je ne parlerai ici que de celles qui se manifestent dans la forme des cellules. Ainsi considérée, la question a en effet une importance pratique au point de vue de la préparation des cultures pures, soit pour l'usage du laboratoire, soit pour l'exploitation.

On se rappelle que notre point de départ est toujours une cellule unique. Supposons que nous ayons obtenu ainsi une culture absolument pure, par ex. de la levûre basse n° 1 de Carlsberg; je nomme précisément cette espèce, parce que c'est avec elle qu'ont été faites la plupart des mes expériences. Nous semons ensuite au hasard quelques cellules de cette culture pure dans une couche de gélatine nourricière sur la face inférieure de la lame de verre fixée à notre chambre humide, et observons les cellules dont la position est telle qu'elles peuvent former chacune une tache de végétation distincte, sans se confondre avec d'autres dans le voisinage. Ces taches, dont nous savons avec certitude que chacune s'est développée d'une seule cellule, sont souvent très différentes, les unes se composant de cellules que leur figure allongée et en forme de boudin peut, d'après M. Reess, faire rapporter au Sacch. Pastorianus, et les autres ayant la forme sous laquelle, d'après l'ancien système, nous nous représentons le Sacch. cerevisiæ. Et pourtant ils appartiennent tous deux à la même espèce, et proviennent tous deux de l'ensemencement d'une seule cellule de cette espèce. On peut en avoir une nouvelle preuve en poursuivant l'expérience. De ces taches on infecte plusieurs ballons renfermant du moût de bière, en ayant soin que chaque ballon d'une série ne reçoive que des cellules de la forme pastorienne, et chaque ballon de l'autre série que des cellules de la forme cerevisiæ. Les végétations qu'on obtient ainsi dans le moût présentent la même différence, mais en continuant les cultures, cette différence entre les deux séries diminue constamment, les cellules en forme de boudin disparaissant peu à peu, de sorte qu'à la fin toutes les végétations ne se composent plus que de cellules ovales. Dans un cas, j'ai cependant dû entreprendre 7 cultures avant que les cellules ovales eussent acquis la prépondérance dans les ballons qui avaient été ensemencés de cellules en forme de boudin. Cette expérience dura environ deux mois.

La forme ovale fut cultivée de la même manière dans la moût de bière, où elle continua à rester ovale. Les deux formes produisirent une bière identique, montrant aussi par là qu'elles appartenaient à une seule et même espèce.

Nous apprenons entre autres par ces expériences qu'il y avait des différences dans les propriétés inhérentes aux diverses cellules (individus), et par suite nos recherches microscopiques sur les taches de levûre nous ont, tout aussi peu que les premières cultures au moût faites avec elle, fourni des renseignements certains sur l'espèce dont il s'agit. Elles nous apprennent en outre que si l'on veut employer comme caractère spécifique la réaction des cellules contre les influences extérieures, il ne faut jamais

s'en tenir à la réaction d'une cellule isolée, mais on doit prendre la somme des réactions d'un grand nombre de cellules.

Bien considéré, il n'y a rien d'étonnant dans ces phénomènes, et ce n'est guère autre chose que ce que nous connaissons déjà chez des champignons supérieurs.

Comme on sait, les opinions sont encore partagées sur la question de savoir si les levûres hautes et basses des brasseries se composent d'une ou de plusieurs espèces. M. Reess croit fermement qu'elles constituent deux variétés d'une seule et même espèce, le Sacch. cerevisiæ, et qu'elles peuvent se transformer l'une dans l'autre, et il relève notamment que la levûre haute de l'ale, après avoir été cultivée pendant quelques jours dans du moût de bière à 4—6^0 C., a été transformée en une levûre basse type. M. Pasteur, comme nous l'avons fait remarquer dans un des mémoires qui précèdent, p. 173, ne s'est pas nettement prononcé sur la question des Saccharomyces, mais se borne à discuter les différentes possibilités; il est cependant plus porté à croire que la levûre basse des brasseries peut facilement se transformer en levûre haute, et que cette transformation s'opère dans les brasseries mêmes. D'autres auteurs se sont également occupés de cette question, mais sans arriver à aucun résultat concluant, car ils n'ont pas expérimenté avec des cultures réellement pures, et le plus souvent on ne sait même pas si les cellules de levûre sur lesquelles ils ont opéré appartenaient ou non au genre Saccharomyces.

Depuis le commencement de 1884, j'ai entrepris une étude méthodique de ces questions. Dans tous les cas, j'ai employé des cultures absolument pures, et ces cultures ont été faites dans des ballons Pasteur à deux cols avec du moût stérilisé. Les levûres basses avec lesquelles j'ai expérimenté étaient le Sacch. Pastorianus I, le Sacch. ellipsoïdeus I, le Sacch. ellipsoïdeus II, les levûres basses n° 1 et 2 de Carlsberg et quelques autres levûres basses essayées dans l'exploitation. J'ai opéré à la température ordinaire d'un appartement, et le moût a été assez souvent renouvelé, de sorte qu'il s'est produit des générations sans nombre à une température qui ordinairement provoque la fermentation haute, et ces organismes ont en outre, avec des intervalles, été exposés à une température plus élevée, 25—30^0 C. Cependant il ne s'est pas produit de phénomènes de fermentation haute, et ils sont toujours demeurés des formes de fermentation basse; pour quelques-unes des espèces ci-dessus mentionnées, ces expériences ont été poursuivies pendant plus de 4 ans.

Depuis la même époque j'ai également cultivé de la même manière les deux espèces types de fermentation haute, le Sacch. cerevisiæ I et le Sacch. Pastorianus III, mais à la température de la fermentation basse, soit à 5—7^0 C. Tant que les ballons sont restés exposés à cette basse température, la fermentation a été faible, surtout dans le ballon contenant la première espèce, et par conséquent sans trace de phénomènes de fermentation haute; mais ils se sont manifestés aussitôt que la culture a été faite à la température ordinaire d'un appartement ou à 25^0 C., et il en a toujours été ainsi même lorsque les ballons ont été examinés pour la dernière fois après une culture de 4 ans.

Par les raisons exposées plus haut, les expériences que nous ve-

nons de décrire sont de toutes celles qui ont été exécutées jusqu'ici les seules qui aient donné un résultat concluant, et ce résultat, c'est que les espèces de fermentation haute et de fermentation basse ne se transforment pas facilement les unes dans les autres, comme quelques-uns le croient, sous l'influence d'une température déterminée. Dans mon mémoire précité sur la formation des voiles chez le genre Saccharomyces, j'ai de plus montré que les levûres basses ne peuvent pas non plus, sous leurs formes de voiles, devenir des levûres hautes, comme M. Pasteur semble le supposer. J'ai en même temps fait voir dans ce mémoire comment des levûres basses peuvent, dans un petit nombre de fermentations, manifester des phénomènes de fermentation haute, après quoi elles reviennent à leur état normal. Nous pouvons donc bien produire des transformations temporaires, mais non de permanentes. Quant à savoir si on ne pourrait pas y arriver en variant les expériences, et en soumettant les cellules à la même influence pendant un temps encore plus long que dans les expériences mentionnées plus haut, c'est une autre question, mais il ne s'agit ici que de faits et ces faits prouvent en tout cas que de pareilles transformations n'ont pas lieu dans les brasseries. Nous ne pouvons nous expliquer les expériences de M. Reess et de M. Pasteur qu'en admettant qu'ils ont dû opérer sur des mélanges de levûre haute et de levûre basse, ce qui pouvait facilement arriver à l'époque où ces expériences ont été faites.

La fin de ce mémoire renferme une série d'observations sur la manière dont plusieurs levûres basses se comportent dans l'exploitation, et par lesquelles on arrive aussi à montrer que ces levûres présentent des caractères nettement différents, qui se conservent aussi longtemps qu'on les cultive dans les mêmes conditions.

Les recherches théoriques faites dans le laboratoire, comme aussi celles qui ont été entreprises dans la pratique de l'industrie de la fermentation, nous ont par conséquent appris qu'il y a plusieurs espèces de Saccharomyces, et non seulement des levûres dites sauvages, mais en même temps des levûres hautes et basses bien caractérisées, qui sont employées dans les brasseries. Exposées a diverses influences extérieures, elles peuvent varier à un haut degré, mais les cultive-t-on pendant longtemps dans les conditions primitives, elles reviennent à leur premier état. Tant qu'elles ont été cultivées dans les conditions qu'elles trouvent dans les brasseries, elles n'ont manifesté que de petites oscillations. De là cette conséquence, que, dans la pratique, nous pouvons et devons les considérer comme des espèces constantes, et régler là dessus notre méthode.

IV.

SUR L'EXAMEN PRATIQUE, AU POINT DE VUE DE SA CONSERVATION, DE LA BIÈRE CONTENUE DANS LES TONNEAUX DES CAVES DE GARDE.

Comme il est difficile de donner un résumé abrégé de ce mémoire, je dois me borner à me référer aux deux éditions complètes, danoise et allemande, mentionnées p. 169.

QUELQUES REMARQUES SUR LE DOSAGE IODOMÉTRIQUE DES ACIDES.

PAR

J. KJELDAHL.

Après avoir, en plusieurs endroits, repris la méthode que j'ai proposée pour déterminer l'ammoniaque par le dosage iodométrique des acides, on semble l'avoir de nouveau abandonnée. La raison de cet abandon doit en partie être recherchée dans le peu de stabilité de la liqueur titrée, mais il est facile de la conserver pendant très longtemps inaltérée, si on la soustrait à l'action de la lumière et de l'acide carbonique en la gardant dans un flacon noir (recouvert d'un vernis à l'asphalte), qui est placé un peu au-dessus de la burette, et porte à sa partie inférieure une tubulure d'où un tube de verre muni d'un robinet amène la liqueur titrée dans la burette, tandis que l'air pénètre dans le flacon par un tube bouché avec de la chaux sodique. Il faut en outre avoir soin de préparer la solution avec un sel pur en petits cristaux et de l'eau fraichement bouillie; dans ces conditions et conservée comme il vient d'être dit, elle restera inaltérée même pendant plusieurs mois en été. Il convient de lui donner une concentration telle que 1 cent. cube corresponde à milligr. de Az (17,7 gr. d'hyposulfite de soude pur cristallisé par litre). L'acide sulfurique, au contraire, doit être deux fois plus concentré, un acide plus faible ayant été envahi par un mucor (une espèce certainement non décrite jusqu'ici, et dont M. le D.r Elfving a commencé l'étude au laboratoire de Carlsberg).

En général, pour préparer une solution d'hyposulfite normale à $^1/_{14}$ ($^2/_{14}$ d'après Mohr), on a certainement donné à cette liqueur une concentration telle que $15^{c.c.}$ p. ex., suffisent exactement pour déterminer la quantité d'iode mise en liberté par un volume égal d'un acide normal à $^1/_{14}$, manière d'opérer toute naturelle lorsqu'on l'emploie dans l'acidimétrie. Mais telle est précisément la cause de l'erreur qu'on commet alors, tandis qu'elle peut être évitée, comme nous allons le faire voir, en titrant la solution d'hyposulfite sur une solution normale d'iode.

La réaction exprimée par l'équation:



$$KIO_3 + 5KI + 3H_2SO_4 = 3K_2SO_4 + 3H_2O + 3I_2 \;.\;.\;.\;.\;.\;(A)$$

ne se fait pas immédiatement dans toute son étendue dans les solutions diluées, comme je l'avais d'abord indiqué, mais comprend deux phases,

dont l'une instantanée et l'autre dans laquelle la réaction, à la température ordinaire. marche avec une extrême lenteur et ne se termine qu'au bout de quelques jours, tandis qu'elle a lieu tout de suite si l'on chauffe la solution à 100^0 en vase clos[1]). Il est à peine nécessaire de faire observer que la quantité d'iode qui se sépare pendant la seconde phase dans les solutions étendues dont il peut être question ici, ne constitue qu'une très faible partie de la quantité totale. La limite entre les deux phases est nettement marquée et il suffit, dans la pratique, qu'on s'en tienne à la première. Nous allons démontrer qu'en opérant ainsi. on n'introduit aucune erreur dans le résultat.

La quantité d'acide qui ne prend pas part tout de suite à la réaction dépend de la quantité d'eau employée et croît avec celle-ci; mais conformément à la marche ordinaire des réactions chimiques, elle est tout à fait indépendante de la quantité d'acide libre qui, à l'origine. se trouvait dans la solution. ce qui a été confirmé par de nombreuses expériences.

Désignons maintenant par a le nombre des centim. cubes d'acide, par α celui des centim. cubes d'acide normal qui y sont contenus, par β la quantité d'iode (exprimée en centim. cubes de solution normale d'iode) qui a été mise en liberté par cette quantité d'acide avec le degré de dilution adopté, par b le nombre de centim. cubes qu'on a employé de la solution d'hyposulfite pour titrer cette quantité d'iode, et en outre par a' celui des centim. cubes d'acide libre après la distillation, et par α', β' et b' les grandeurs correspondantes. La quantité d'hyposulfite qu'on emploie en moins doit alors être égale au nombre des centim. cubes d'acide normal qui ont été saturés par l'ammoniaque, et on a par conséquent:

$$b - b' = \alpha - \alpha'.$$

Comme la réaction, on l'a vu, n'est pas complète et que, par suite, il ne se sépare pas une quantité d'iode équivalente à la quantité d'acide. on aura:

$$\alpha = \beta + k, \ldots\ldots (1)$$

où k est constant pour le même degré de dilution. Lorsqu'on titrera après la distillation, la même quantité d'acide ne prendra pas part à la réaction, de sorte qu'on a aussi:

$$\alpha' = \beta' + k \text{ (même constante)} \ldots\ldots (2).$$

[1]) Cette seconde phase est la cause principale de la réapparition, mentionnée p. 9, de la couleur bleue, tandis que l'acide carbonique ne joue ici qu'un petit rôle. C'est ce qu'on peut constater, entre autres, en appliquant la méthode iodométrique à la détermination de l'acide carbonique à l'état de combinaison dans l'eau, usage auquel cette méthode convient parfaitement. On trouve alors que les résultats ne diffèrent pas beaucoup, soit qu'on titre aussitôt après avoir ajouté de l'acide sulfurique au volume d'eau à examiner, soit qu'on chasse d'abord l'acide carbonique du mélange en faisant bouillir ce dernier dans une capsule de porcelaine ou de platine. Si le mélange est porté à l'èbullition dans un ballon, on obtient au contraire un résultat beaucoup plus fort, car l'eau dissout une partie de l'alcali du verre.

D'après les désignations employées, on a en outre:

$$\frac{\alpha'}{\alpha} = \frac{a'}{a} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots (3)$$

et

$$\frac{\beta'}{\beta} = \frac{b'}{b} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots (4).$$

c'est-à-dire, que les volumes d'acide normal et de solution normale d'hyposulfite (= le volume de solution normale d'iode) contenus dans différents volumes d'acide et d'hyposulfite, sont proportionnels à ces volumes.

On trouve donc:

$$b - b' = \alpha - \alpha' = \beta - \beta' = \frac{\beta}{b}(b - b').$$

d'où l'on tire:

$$b = \beta,$$

c'est-à-dire, que la solution d'hyposulfite doit être titrée sur une solution normale d'iode. Si on la titrait sur un acide normal ($b = \alpha$), on aurait $b = \beta + k$, et l'équation $b - b' = \alpha - \alpha'$ ne serait pas satisfaite excepté pour $k = o$ (des solutions normales concentrées).

Dans la pratique, pour déterminer le titre de l'hyposulfite, on se sert le plus commodément d'une solution de sulfate d'ammoniaque pur d'une concentration connue, telle, par exemple, qu'elle renferme 1 gr. de $Am^2\,SO^4$ par 100 centim. cubes. L'ammoniaque obtenue par la distillation de 10 centim. cubes de cette solution doit alors correspondre à une différence en moins de 21,21 centim. cubes de la solution d'hyposulfite. Ce procédé, recommandé par le D[r] Knublauch dans Zeitschr. f. anal. Chemie XXI, p. 161, pour titrer l'acide normal, est incontestablement très rationnel pour déterminer la concentration de l'hyposulfite dans l'emploi qu'il doit trouver ici. On trouve en effet que le titre de la dissolution est exactement le même, qu'il soit déterminé à l'aide de l'iode ou du sulfate d'ammoniaque.

Si $b = a$, on trouvera:

$$b' = a' - \frac{k}{\beta}(a - a'),$$

c'est-à-dire que si un certain nombre de centim. cubes d'acide et de la solution d'hyposulfite correspondent, cela ne sera plus le cas avec d'autres volumes. L'écart sera proportionnel à la grandeur de $a - a'$ et de k, ou, en d'autres termes, il sera d'autant plus grand que les volumes employés différeront davantage l'un de l'autre, et que les solutions avec lesquelles on opère seront plus étendues. Par conséquent, si l'on veut se servir d'un acide pour déterminer le titre de la solution d'hyposulfite, il faudra toujours en prendre le même volume.

Relativement à l'addition de l'iodate de potasse et de l'iodure de potassium, il y a à observer ce qui suit. Tandis qu'il faut ajouter l'iodate dans la proportion indiquée par l'équation (A) pour qu'il se sépare une quantité d'iode équivalente à celle de l'acide employé, on peut obtenir ce résultat avec bien moins d'iodure que les 5 molécules que demande cette équation, et même avec la plus faible trace de ce réactif, ce qui s'explique par la circonstance que, pendant la réaction avec l'hy-

posulfite, il se forme constamment de l'iodure de sodium, et c'est pourquoi il suffit d'une trace d'iodure ou d'iode libre pour déterminer la réaction. Celle-ci peut même se faire sans addition d'iodure; seulement il faut alors employer une quantité notablement plus grande de la solution d'hyposulfite pour la même quantité d'acide, et la réapparition de la couleur bleue est beaucoup plus marquée, ce qui rend assez difficile de saisir nettement la fin de la réaction. Les mêmes irrégularités se reproduisent, quoique à une degré moindre, lorsqu'on ajoute l'iodure de potassium en trop petite quantité. L'explication la plus vraisemblable qu'on en puisse donner est sans doute que l'acide iodique, lorsqu'il est seul, exerce sur l'hyposulfite une action oxydante accompagnée d'une séparation d'iode, qui ensuite agit également sur l'hyposulfite comme à l'ordinaire, en d'autres termes, que l'acide iodique exerce une action oxydante sur l'hyposulfite et par son oxygène et par son iode.

Par là s'explique aussi l'emploi, ci-dessus mentionné, d'une quantité plus grande de la solution d'hyposulfite lorsqu'on ajoute l'iodate seul ou relativement en excès. En ajoutant l'iodate et l'iodure dans les proportions indiquées par l'équation (A), l'acide iodique et l'acide iodhydrique mis en liberté par l'acide sulfurique se décomposent aussitôt mutuellement, de sorte que le premier ne peut plus exercer une action oxydante sur l'hyposulfite, et que la quantité qu'on emploie de la solution de l'hyposulfite devient normale. Cependant il vaut mieux prendre l'iodure de potassium en léger excès. Le procedé suivant, qui est employé ici, donne des résultats parfaitement exacts.

La distillation une fois terminée, on verse de l'eau distillée dans le flacon jusqu'à la marque qui indique 100 centim. cubes, conformément à ce qui a été dit plus haut sur l'influence du volume. On ajoute ensuite 10 centim. cubes d'une solution d'iodure de potassium à 5 %, de l'eau d'amidon et 2 centim. cubes d'une solution d'iodate de potasse à 4 %. Pour préparer l'eau d'amidon, j'emploie de l'amidon soluble, qu'on obtient facilement en faisant digérer pendant une semaine, à la température ordinaire, de l'amidon de pommes de terre dans de l'acide chlorhydrique étendu, en le lavant ensuite par décantation et le séchant entre des feuilles de papier à filtrer. L'amidon ainsi obtenu se dissout lorsqu'on le chauffe avec de l'eau, et la dissolution, après avoir été saturée de sel marin, se conserve indéfiniment.

UN APPAREIL DISTILLATOIRE A L'USAGE DE LA DÉTERMINATION DE L'AZOTE.

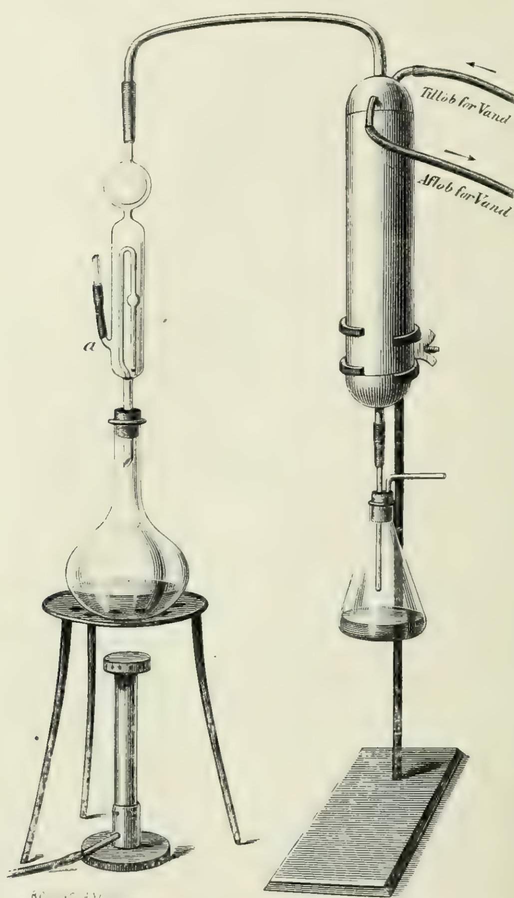
PAR

J. KJELDAHL.

Peu de temps après la publication de mon procédé de dosage de l'azote, je remarquai deux petites sources d'erreur dans la distillation de l'ammoniaque, à savoir l'action exercée sur le verre du tube réfrigérant par la vapeur d'eau, qui dissout un peu de son alcali, et les projections causées par le dégagement d'hydrogène que produit le zinc, et par lesquelles des particules du contenu alcalin du ballon distillatoire, malgré tous les appareils intercalés entre ce dernier et le tube réfrigérant, peuvent être entraînées dans la récipient. Ces inconvénients ont aussi été observés dans plusieurs endroits où la méthode est pratiquée, et, à cette occasion, il a été décrit un assez grand nombre d'appareils distillatoires qui devaient les faire éviter. L'appareil représenté ci-contre, dont je me suis servi pendant longtemps, offre, je crois, contre ces sources d'erreur toute la garantie possible.

Après avoir sans succès essayé de surmonter le ballon distillatoire de divers appareils, j'en vins à me convaincre qu'un lavage avec de l'eau est le seul moyen sûr de purger les vapeurs des projections ci-dessus mentionnées, car autrement elles sont entrainées dans la route que suit le courant des vapeurs, même si elle est très tortueuse ou en grande partie ascendante. Je me sers donc de l'appareil laveur représenté sur la figure; par le tube latéral a, qui pendant la destillation, est fermé par un tuyau de caoutchouc et un bouchon de verre, j'introduis au préalable quelques gouttes d'eau, que les vapeurs venant du ballon par le tube de verre recourbé qui se termine tout près du fond de l'appareil laveur, sont obligées de traverser. L'eau qui se rassemble dans ce dernier et y est maintenue en ébullition par les vapeurs, ne retient pas d'ammoniaque: la distillation une fois terminée, elle est aspirée dans le ballon dès qu'on éteint la lampe. L'appareil laveur est par un

court tuyau en caoutchouc relié au tube réfrigérant qui est en **étain**, et dont la branche descendante traverse verticalement le réservoir d'eau



en cuivre étamé, qui est complètement fermé et muni comme à l'ordinaire de tubes pour l'entrée et la sortie de l'eau. L'ammoniaque distillée est recueillie comme on l'a expliqué p. 17.

SUR LE GLUTEN ET SA PRÉSENCE DANS LE GRAIN DE BLÉ.

PAR

W. JOHANNSEN.

Le présent mémoire ne s'occupe pas de la composition chimique du gluten, mais cherche à éclaircir les deux questions suivantes qui ont été souvent débattues dans les derniers temps: 1) Comment le pâton de gluten se forme-t-il de la farine de froment, lorsqu'on opère par le procédé bien connu (en pétrissant la farine avec de l'eau et lavant ensuite), et 2) quels sont les tissus du grain de blé qui jouent ici un rôle.

I.

La quantité de gluten frais et humide qui peut être extraite d'un échantillon donné de farine, varie fortement avec la mode de préparation; mais si l'on opère toujours de la même manière, les dosages parallèles effectués par plusieurs personnes présentent néanmoins des différences notables[1]) Cela n'a rien d'étonnant, comme la main joue un rôle principal dans cette opération. Mais lorsque, comme ici, il s'agit de valeurs relatives, de l'influence des agents extérieurs sur des échantillons de farine normale sans défaut, ces écarts individuels sont de peu d'importance; la question est seulement de savoir si les résultats obtenus par le même opérateur sont concordants. Après quelque exercice, je remarquai que mes dosages parallèles variaient souvent beaucoup lorsqu'ils étaient faits à des jours différents, tandis que j'obtenais en général une bonne concordance en les faisant le même jour. Mes séries d'expériences ont donc toujours été faites le même jour, à moins qu'elles n'eussent pour but de constater l'influence du repos de la pâte.

MM. Benard et Girardin[2]) disent que la quantité de gluten augmente, lorsqu'on laisse reposer quelque temps la pâte faite avec la

[1]) Voir les indications de M. Balland, Journal de Pharm. et de Chim. 5e série, T. 8, 1883, p. 358.

[2]) Journal de Pharm. et de Chim. 5e série, T. 4, 1881, p. 127.

farine avant de procéder au lavage. Le gluten frais devient alors plus riche en eau: cependant cette quantité plus grande de gluten ne provient pas seulement de là; la quantité absolue de gluten sec s'accroit aussi. Ces indications se sont trouvées confirmées, et je puis ajouter que l'accroissement est réellement dû à une augmentation de la matière azotée, comme on peut le voir par les exemples suivants.

40 grammes de farine pétris avec 30 gr. d'eau ont donné:

	Gluten frais en gr.	% eau dans le gluten	Matière sèche en gr.	% azote dans la matière sèche	Quantité d'azote en milligr.
lavage immédiat	8	61,6	3,07	13,13	403
— après 1 heure ..	10,6	62,7	3,95	13,39	530

Il a en même temps été constaté que la matière sèche, dans le gluten d'un échantillon de farine donné, contient une proportion % d'azote à peu près constante, même si le mode de préparation varie autant que dans le présent travail. Quelques-unes des expériences de contrôle que j'ai faites à ce sujet sont mentionnées dans le texte danois; elles avaient pour but de montrer que les dosages de gluten frais cités plus loin sont bien concluants.

J'ai ordinairement, pour chaque dosage, pris 25 gr. de farine, qui étaient pétris pendant 2—5 minutes suivant la quantité d'eau plus ou moins grande que j'employais. Si la pâte devait reposer quelque temps avant le lavage, elle était mise dans une capsule de porcelaine couverte. Le lavage a été exécuté absolument comme chez M. Balland (l. c.), partie sur un tamis de crin, partie sur un tamis de gaze très fine.

Le gluten, découvert par Beccari, est connu depuis le milieu du siècle dernier. Qu'il se trouve préformé dans le froment, c'est l'opinion la plus ancienne et la plus répandue. L'interprétation de Raspail, d'après laquelle le pâton de gluten se forme de membranes de cellules enchevêtrées, et l'azote qu'il contient est dû à une absorption de l'azote de l'atmosphère, ne semble pas avoir été généralement acceptée. Elle a été écartée par Payen[1]), qui a montré que le gluten se compose de matière protéique et est déposé entre les grains d'amidon dans l'endosperme du froment. Plus tard, M. Péligot[2]) a émis l'opinion que le gluten a besoin d'une matière grasse pour pouvoir se former dans le traitement de la farine par l'eau. Il ne conteste nullement la nature protéique du gluten, mais croit seulement que la matière grasse rend possible l'union, en une masse, des particules de la matière protéique, et de plus que la proportion de matière grasse contenue dans la farine (1 % env.) est justement celle qui convient. Il cite à l'appui de cette idée deux expériences dans lesquelles de la farine épuisée par l'éther n'a pas donné de gluten, et de la farine additionnée de 4 % de matière grasse du froment n'a donné la quantité normale de gluten que grâce à un lavage exécuté avec les plus grandes précautions.

---

[1]) Mémoires présentés par divers savants à l'Académie des Sciences, T. 9, 1846, p. 11.

[2]) Annales de chimie et de physique, 3e série, T. 29, 1850, p. 5—34.

Cependant les idées de M. Péligot ne paraissent pas avoir été adoptées. et ce doit bien aussi être quelque circonstance accessoire qui est cause que sa farine sans matière grasse n'a pas donné de gluten. J'ai souvent épuisé de la farine avec de l'éther pur: après évaporation complète de l'éther resté dans la farine. celle-ci a donné autant de gluten que dans son état primitif: seulement ce gluten était gris blanchâtre, comme l'éther dissout la matière colorante jaune de la farine. M. Péligot, dans son Traité de chimie analytique[1]), maintient encore l'exactitude de son expérience; mais il fait remarquer qu'avec un ferment glutinogène, cette influence de l'éther peut aussi s'expliquer par la propriété qu'il aurait de coaguler le ferment.

La supposition qu'un pareil ferment joue un rôle dans la préparation du gluten a surtout été émise par MM. Bischoff et Weyl[2]). Ces auteurs croient que certaines globulines (»Pflanzenmyosin«) sont la substance mère du gluten, qui se forme seulement lorsque l'eau agit sur la farine à l'aide du ferment existant dans le froment. Ils trouvent en effet qu'on n'obtient plus de gluten en se servant, au lieu d'eau, d'une solution de sel marin à 20 %, ou en lavant d'abord la farine avec une solution analogue à 15 %, avec de l'acide chlorhydrique dilué ou une solution étendue de carbonate de soude, et ils expliquent ces faits en partie par le départ des globulines par le lavage, en partie par l'action du sel sur le ferment. Un chauffage à 60°, prolongé pendant 2—4 jours, doit aussi avoir rendu impossible la préparation du gluten. Les essais faits en vue d'isoler le ferment supposé n'ont donné aucun résultat. Du reste les détails manquent, et les indications sont souvent très vagues.

Cependant l'hypothèse d'un ferment est devenue très vraisemblable par quelques expériences que M. Kjeldahl a eu l'occasion de faire au laboratoire de Carlsberg. Il existe en effet une analogie frappante entre l'influence de la température sur l'action des ferments étudiés auparavant par M. Kjeldahl[3]), et sur la préparation du gluten. En opérant à 0°, on n'obtenait pas du gluten, mais à des températures croissantes, on en obtenait une quantité de plus en plus grande jusqu'à un maximum de 40°; au-dessus de cette température, la quantité de gluten diminuait de nouveau. Nous donnerons comme exemple la série d'expériences qui suit: des portions de 40 gr. de farine sont chauffées à diverses températures, on ajoute ensuite à chacune 30 gr. d'eau chauffée au degré correspondant, et après une demi-heure de repos à la même température, on lave sur un tamis en crin. Le résultat est indiqué dans le tableau ci-dessous.

Températures	0°	5°	10°	15°	25°	40°	50°	60°	70°
Poids de gluten humide...	0	6	10	11.5	13	15,5	11,5	7	4 gr.

Parmi les autres observations de M. Kjeldahl, nous mentionnerons dans ce résumé seulement celle-ci, que le bichlorure de mercure et d'au-

[1]) Péligot, Traité de chimie analytique appliquée à l'agriculture. Paris 1883, p. 367.

[2]) Berichte d. deutschen chem. Gesellschaft, Bd. 13. 1880, p. 367.

[3]) Meddelelser fra Carlsberg Laboratorium, T. 1, Résumé français, p. 121 et 186.

tres sels métalliques — même en solution très étendue — empêchent la formation du gluten. Enfin il a constaté qu'on pouvait obtenir du gluten d'une vieille farine ne donnant pas de gluten, et même de la farine d'orge, en la mélangeant avec une quantité convenable de bonne farine de froment. Dans toutes ces expériences, il était naturel, on le voit, de recourir à l'hypothèse d'un ferment pour expliquer les résultats; il ne manquait qu'une chose, l'isolement du ferment cherché. Diverses méthodes furent essayées, mais toutes ayant donné un résultat négatif, M. Kjeldahl en demeura là pour le moment.

Il y avait donc lieu de soumettre la question à un nouvel examen, et je la repris en procédant à une comparaison entre une farine artificielle contenant du gluten tout formé et la farine ordinaire de froment. Ma farine artificielle était préparée de deux manières, soit en mélangeant du gluten desséché et finement pulvérisé[1]) avec de l'amidon pur, soit en pétrissant du gluten frais et humide avec de l'amidon, et en séchant et pulvérisant ensuite la pâte.

Cette farine artificielle se prête facilement à la préparation du gluten par la méthode ordinaire, et exige seulement un peu plus d'eau dans la pâte. Vis-à-vis de la chaleur, des acides, du sublimé, etc., elle se comporte absolument comme la farine ordinaire. L'influence de la température ressort des chiffres suivants donnés par une série d'expériences analogues à celles de M. Kjeldahl, mais faites avec des échantillons contenant 50 gr. de farine et 30 gr. d'eau.

Température..........	0^0[2])	9^0	19^0	30^0	40^0	50^0	60^0
Gluten frais en gr.	0	6,2	8,2	9	5	0,5	0

Le bichlorure de mercure agit sur la farine artificielle absolument de la même manière que sur la farine ordinaire.

Exemples: 40 gr. de farine de froment pétris avec 20 gr. de liquide ont donné:

avec l'eau....................	9,5	gr.	de	gluten	humide,
avec le sublimé, solution à 0,1 %..	6,5	-	-	—	—
- - — — à 1 %..	0	-	-	—	—

La même quantité de farine artificielle pétrie avec 25 gr. de liquide a donné:

avec l'eau....................	6,4	gr.	de	gluten	humide,
avec le sublimé, solution à 0,1 %..	2,4	-	-	—	—
- - — — à 1 %..	0	-	-	—	—

l'analogie est donc complète.

[1]) D'après les iudications de M. Ritthausen »Die Eiweisskörper«, 1872, p. 30.

[2]) Cet échantillon a été préparé avec 35 gr. d'eau, comme une moindre quantité d'eau entraîne un plus grand travail pour le pétrissage, et que la pâte s'échauffe par là de plusieurs degrés. A 22°, avec la même quantité d'eau, j'ai obtenu 8,5 gr. de gluten; on voit donc que ce petit écart n'a en soi aucune importance.

Les acides étendus et les dissolutions salines ont également la même action sur la farine artificielle et la farine naturelle.

L'hypothèse d'un ferment perd par là ses meilleurs soutiens, bien qu'elle ne soit pas encore directement réfutée. Mais, en tout cas, l'hypothèse seule ne peut expliquer le fait que la solution de sublimé, employée comme eau de pétrissage, réduit beaucoup plus fortement le produit en gluten lorsque la pâte a reposé plusieurs heures que lorsqu'elle n'a reposé que $^1/_2$ heure, comme on le verra par les expériences mentionnées plus bas. Elles montrent en même temps combien il importe d'employer un tamis fin de gaze, quand il s'agit de constater la formation ou la présence de petites quantités de gluten, ou d'un gluten friable dont les particules sont facilement entraînées par l'eau à travers un tamis en crin.

La farine employée, pétrie avec de l'eau et laissée en repos pendant 20 minutes, a donné 28 % de gluten. Avec la solution de sublimé, on a obtenu les quantités % suivantes de gluten.

Concentration de la solution de sublimé	Après 20 minutes de repos		Après 20 heures de repos	
	Tamis de crin	Tamis de gaze	Tamis de crin	Tamis de gaze
0,2 %	26	26	4	15
0,4 -	20	25	1	11
1 -	13	19	0	0

Dans les dissolutions étendues, le sublimé n'agit donc que peu à peu; dans celles qui sont plus concentrées, il diminue bien aussitôt le produit en gluten, mais son action augmente beaucoup par le repos de la pâte. Il semble donc que le plus simple est d'admettre que le sublimé agit en tannant lentement les particules de gluten préformé, comme c'est seulement le cas pour la farine artificielle.

L'impossibilité de la coopération d'un ferment dans la formation du gluten n'est certainement pas démontrée par les expériences ci-dessus mentionnées, et l'hypothèse d'un ferment eût-elle même perdu sa raison d'être, on sait qu'une hypothèse une fois émise a souvent la vie dure. Aussi ne sera-t-il peut-être pas superfin de faire voir comment toutes les circonstances qui, dans la préparation du gluten, ont été invoquées en faveur de l'hypothèse d'un ferment, s'expliquent parfaitement sans elle.[1])

Pour ce qui regarde d'abord l'indication de MM. Bischoff et Weyl, que la farine, après avoir été chauffée quelque temps à 60°, perd sa faculté de donner du gluten, cela n'est nullement confirmé par d'autres auteurs[2]) de même que je n'ai pas non plus constaté de deminution

[1]) Qu'en épuisant la farine par l'alcool, on puisse obtenir certains éléments du gluten, cela ne prouve rien à priori contre la présence d'un ferment. Nous rappellerons ici, par exemple, que l'action de l'émulsine sur l'amygdaline n'est pas neutralisée par l'alcool à 35 % (Wernitz).

[2]) Voir Péligot, Ann. d. Chim. et de Phys. 3. série, T. 29, p. 22.

dans le poids du gluten obtenu après avoir soumis la farine à ce traitement. Relativement à des températures plus élevées, on trouve quelques contradictions entre les résultats des différents expérimentateurs. Elles s'expliquent peut-être par les différents degrés d'humidité des échantillons de farine employés, comme je l'ai supposé pour les expériences mentionnées dans le texte danois. Mais expliquer ces contradictions par des phénomènes de coagulation des particules de matière protéique des échantillons de farine, c'est recourir à des hypothèses tout aussi plausibles que celle de la présence d'un ferment.

L'action des dissolutions salines concentrées s'explique naturellement par la trempe lente et incomplète des particules de gluten et par la faible viscosité qui en résulte.

L'influence de la température est tout aussi facile à comprendre sans le secours d'un ferment. Sous l'action du froid, la trempe des particules de matière protéique se fait très lentement. elles adhèrent mal les unes aux autres et sont emportées à travers le tamis, et une trop forte chaleur coagule ou dissout les particules du gluten.

Que le repos de la pâte augmente le produit en gluten, s'explique facilement par le plus grand degré de ramollisement (viscosité) qu'il acquiert, ce qui se montre aussi par sa plus grande richesse en eau.

Relativement à l'action d'une trop grande quantité d'eau sur la pâte, et à l'action d'une addition d'amidon dans la farine, je me réfère au texte danois.

Les acides et les alcalis étendus dissolvent plus ou moins vite le gluten suivant leur état de concentration. Il n'est pas nécessaire pour cela de supposer qu'ils exercent une action destructive sur un ferment.

L'hypothèse d'un ferment producteur du gluten est donc complètement superflue, et le gluten doit par suite être regardé comme préformé dans le grain de froment, ce qui du reste est pleinement confirmé par les recherches microscopiques qui suivent.

II.

C'est seulement dans l'endosperme du grain de froment qu'on peut chercher la place du gluten. L'endosperme (Fig. 1) se compose d'un tout cohérent, d'un seul système de cellules qui n'ont pas de liaison organique avec les autres tissus du grain. Les cellules périphériques de l'endosperme (considérées à tort par des auteurs français comme appartenant au tégument, et appelées membrane embryonale, endopleura) se distinguent par leurs épaisses parois, leurs noyaux très distincts et un autre coutenu que celui des cellules intérieures.

Les cellules périphériques du gluten ont joué un certain rôle dans l'histoire du gluten, notamment dans la littérature allemande, et le nom allemand de »Kleberzellen« (cellules de gluten) exprime l'idée qu'on s'en fait encore assez généralement, que le gluten se trouve dans ces cellules. Avant que les recherches des 20—30 dernières années eussent commencé à distinguer les unes des autres les matières azotées de nature très diverse qui se trouvent dans les plantes, toute substance

azotée végétale, pour ainsi dire, passait pour être d'albumine, et le gluten était regardé comme le type des matières protéiques des plantes, de même que l'albumine de l'œuf l'a été pour les animaux. Et lorsque l'analyse chimique eut montré que le son était riche en matières azotées, qui furent par conséquent assimilées au gluten, on en conclut que les cellules périphériques de l'endosperme, dont la plupart passent dans le son, étaient particulièrement riches en gluten.

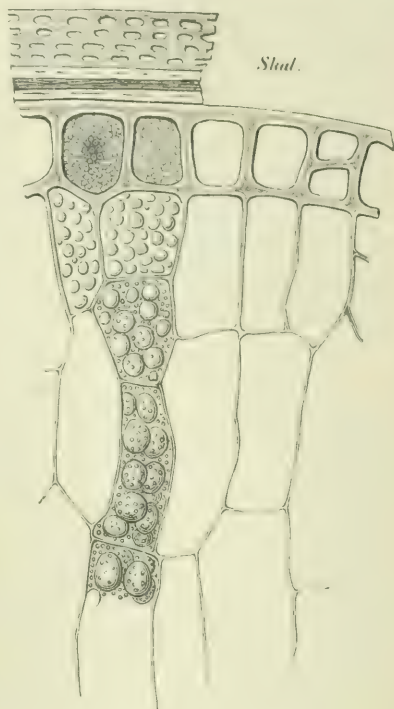


Fig. 1.

Quand le célèbre botaniste allemand Th. Hartig eut découvert les grains d'aleurone (1855—1858), découverte qui l'amena à cette conclusion précipitée que toute la matière protéique déposée dans les grains y existait sous cette forme, les grains d'aleurone reçurent le nom de »Klebermehl« (farine de gluten), nom qui porte la trace de deux hypothèses: 1) que la matière azotée des grains est identique au gluten et 2) que ce gluten n'existe que sous forme de grains d'aleurone.

Ces noms qui »signifient quelque chose« sont, comme on sait, les meilleurs soutiens d'anciennes théories inexactes, et le nom de »Klebermehl« n'a pas peu contribué à embrouiller la question. En effet, M. Hartig croyant avoir trouvé dans les cellules périphériques un grand nombre de grains d'aleurone petits, mais distincts et très résistants — ce qui s'accordait avec les analyses chimiques — ces cellules reçurent, comme il a été dit plus haut, le nom trompeur de »Kleberzellen« et même de »Kleberschicht« (couche du gluten).

Mais le gluten ne se trouve pas du tout dans ces cellules. Il y a toujours eu des voix pour le dire et pour indiquer la place du gluten dans les cellules intérieures de l'endosperme. Ce qui a été publié de plus important à ce sujet est mentionné dans mon mémoire sur l'endosperme de l'orge (Meddelelser fra Carlsberg, T. II, 3e livraison, 1884); depuis cette publication, M. Aimé Girard, en particulier, a discuté la question. Mais la méthode microscopique de cet auteur donnant des résultats inexacts, je me réfère au mémoire précité, qui montre que les cellules périphériques renferment de petits grains extrêmement peu résistants d'une matière azotée qui sont logés dans une masse protoplasmatique molle et riche en matière grasse. (Les grains ob-

servés par M. Hartig après une préparation ordinaire dans de l'eau, et appelés par lui grains d'aleurone sont des gouttes de matière grasse). Le gluten ne peut être extrait de ces cellules; l'eau en détruit le contenu.

Mais, comme Payen l'a déjà indiqué, le gluten se trouve dans les cellules intérieures de l'endosperme. La Fig. 1 montre que les cellules amylifères les plus voisines de la couche périphérique sont plus petites que celles qui sont au-dessous; on voit de plus que les grains d'amidon, dans les cellules extérieures, sont de grandeur moyenne et plus isolées, tandis que dans les cellules des couches intérieures, ils sont beaucoup plus serrés et à la fois très gros et très petits. Les grains d'amidon sont partout logés dans le protoplasme desséché, dont l'épaisseur est par conséquent maximum à la périphérie, tandis qu'il devient très mince intérieurement vers le centre du grain. Le gluten forme la partie principale de ce protoplasme, ce qu'on constate facilement en isolant quelques cellules amylifères à l'état sec sur une lame porteobjet, et en les délayant dans une goutte d'eau. La Fig. 2 montre les grains d'amidon devenus libres, tandis que les parties non dissoutes du protoplasme donnent naissance à des filaments visqueux, au gluten.

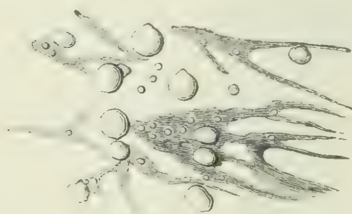


Fig. 2.

En traitant de la même manière d'autres espèces de grains, on n'obtient pas de gluten. Le production instantanée du gluten est une nouvelle preuve qu'il est réellement préformé dans le grain; dans le cas contraire, il faudrait admettre que le ferment est également réparti dans les particules qui donnent naissance au gluten. Mais d'après tout ce qu'on sait des ferments solubles des grains, ils semblent toujours être séparés des substances sur lesquelles ils agissent.[1])

D'après tout ce qui précède, on peut donc dire que le gluten constitue la masse principale du protoplasme des cellules amylifères de l'endosperme du grain de froment.

Quant à la couche périphérique (la »Kleberschicht« proprement dite), on sait que M. Mège-Mouriès a publié plusieurs observations qui récemment ont été en partie confirmées, notamment par M. Girard (l. c.). M. Mège-Mouriès croyait que ces cellules contenaient un ferment analogue à la diastase, qui, en dissolvant et en transformant l'amidon dans la pâte de la farine non blutée, contribue surtout à produire l'état pâteux bien connu de cette espèce de pain. Mais cet auteur a exagéré l'action du contenu de ces cellules, en l'assimilant aussi à celle du ferment lactique, etc. erreur facile à comprendre dans l'état de la microbiologie à cette époque.

1) Il sera question plus loin de la diastase. L'émulsine se trouve dans d'autres tissus de l'amande que l'amygdaline; voir ma note dans Annales des sciences naturelles, botanique, série 7, T. 6, p. 118.

M. Balland[1]) n'a, chose remarquable, pas évité une erreur analogue, car il attribue au grain lui-même »en dehors de toutes causes extérieures« un ferment insoluble (soit un organisme microscopique) qui transforme le gluten et se trouve, suivant lui, dans les membranes qui entourent l'embroyon (c-à-d. la couche périphérique de l'endosperme) et passent, comme on sait, en majeure partie, dans la son. J'ai repris les expériences de M. Balland en employant de l'extrait de son pour la préparation du gluten, mais je n'ai jamais, comme il l'indique, obtenu un produit moindre, même après avoir laissé reposer la pâte pendant 24 heures. Mais si l'extrait de son, conservé pendant quelques jours, était devenu acide, la quantité de gluten obtenu devenait moindre ou même nulle, comme le montre le tableau ci-dessous.

Trois échantillons de 50 gr. de farine pétris avec respectivement 25 c. c. d'eau, d'extrait de son fraichement préparé et d'extrait de son préparé depuis 3 jours, ont donné:

Pâte préparée avec	Après 2 heures de repos	Après 20 heures de repos
de l'eau..............	7,3 gr. de gluten	7,7 gr. de gluten
de l'extrait de son frais..	7,7 - - —	7,8 - - —
de l'extrait de son acide..	5,6 - - —	0 - - —

Les expériences suivantes prouvent que ce n'est pas l'acide formé dans l'extrait de son qui diminue le produit en gluten. On a employé les mêmes échantillons de farine et un extrait de son datant de deux jours. Une partie en a été filtrée, et une autre stérilisée à 100° dans un flacon formé et refroidie. On a obtenu:

Pâte préparée avec	Après 2 heures de repos	Après 20 heures de repos
Extrait non filtré	7,8 gr. de gluten	[illegible] gr. de gluten
Extrait filtré............	7,8 - -	4,0 - - —
Eau mêlée au résidu de la filtrat. de 50 c. c. extr.	7,7 - - —	0 - - —
Extrait stérilisé.........	non dosé	8,2 - - —

Contrairement à l'opinion de M. Balland, je dois donc maintenir que les tissus du grain ne renferment aucun ferment soluble[2]) ni insoluble qui soit destructeur du gluten, et que les observations faites par

[1]) l. c. T. 8, p. 501 et T. 12, p. 158.

[2]) Abstraction faite des petites quantités d'un ferment peptique qui se forme pendant la germination, et qui peut-être (?) ne se trouve qu'en quantite extrêmement minime dans le grain au repos.

cet auteur doivent être rapportées à des organismes étrangers au grain. Que les bactéries qui se trouvent sur le grain, sur ses barbes, ses sillons, etc. jouent un rôle dans la fermentation spontanée du pain, c'est un fait qui résulte entre autres des études de M. Laurent.[1])

Les cellules périphériques de l'endosperme ne contiennent donc, d'après ce qui précède, ni gluten ni ferment pouvant détruire le gluten, mais de petits grains d'une matière azotée logés dans un protoplasme adipeux. Ce qu'elles renferment de plus remarquable est cependant la diastase, dont la localisation dans ces cellules (et dans le germe), d'après les expériences de M. Girard que je ne puis que confirmer, ne saurait plus être mise en doute.

[1]) Les microbes boulangers. Bull. de la Soc. roy. de Belgique, T. 24, 2e partie, 1885.

TABLE DES MATIÈRES DU TOME DEUXIÈME.

Première livraison, 1883.

Deuxième livraison, 1883.

Troisième livraison, 1884.

Quatrième livraison, 1886.

Cinquième livraison, 1888.

Erratum.

Page 10, ligne 11, au lieu de: $^7/_{200}$ lisez: $^1/_{14}$.